

Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
(Direktor: Prof. Dr. med. M. D. Menger)

ANGIOGENESE IN DER PATHOPHYSIOLOGIE UND THERAPIE DER ENDOMETRIOSE

Eine experimentelle *in vivo* Studie am Syrischen Goldhamster

***Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Theoretischen
Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes***

2008

vorgelegt von Antje G. Laschke (geb. Elitzsch)
geb. am 02.02.1976 in Borna

Datum:

Dekan:

Berichterstatter:

MEINEN ELTERN
MEINER FAMILIE
UND
ALLEN, DIE IMMER IN UNSERER ERINNERUNG SIND

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Summary	3
3. Einleitung	5
4. Ziel der Studie	12
5. Material und Methodik	13
5.1. Versuchstiere	13
5.2. Modell	13
5.2.1. Modell der Rückenhautkammer	13
5.2.2. Implantation der Rückenhautkammer	13
5.2.3. Hormonelle Synchronisierung	15
5.2.4. Isolierung von Endometrium	15
5.2.5. Transplantation von Endometrium	17
5.2.6. Ovariectomie	17
5.3. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	17
5.3.1. Mikrozirkulatorische Parameter	18
5.3.1.1. Fläche	19
5.3.1.2. Funktionelle Kapillardichte	19
5.3.1.3. Kapillardurchmesser	19
5.3.1.4. Blutzellgeschwindigkeit	20
5.3.1.5. Mikrovaskulärer Blutfluss	20
5.4. Histologie	20
5.4.1. Konventionelle Histologie	20
5.4.2. Immunhistochemie	21

5.5.	Western Blot	21
5.6.	Aorten-Ring-Assay	22
5.7.	Experimentelles Protokoll	23
5.7.1.	Versuchsablauf	23
5.7.2.	Versuchsgruppen	24
5.7.2.1.	Bedeutung von Hormonstatus und Endometrium-Fragmentgröße	24
5.7.2.2.	Bedeutung der pro-angiogenen Faktoren VEGF, FGF und PDGF	24
5.7.2.3.	Einfluss des selektiven Cyclooxygenase-2-Inhibitors NS398	25
5.7.2.4.	Einfluss des Immunsuppressivums Rapamycin	25
5.8.	Statistik	26
6.	Ergebnisse	27
6.1.	Bedeutung von Hormonstatus und Endometrium-Fragmentgröße	27
6.1.1.	Entwicklung der Transplantate	27
6.1.2.	Mikrovaskuläres Netzwerk	27
6.1.3.	Mikrohämodynamik	30
6.1.4.	Leukozyten-Endothelzell-Interaktion	32
6.1.5.	Histologie und Immunhistochemie	32
6.2.	Bedeutung der pro-angiogenen Faktoren VEGF, FGF und PDGF	33
6.2.1.	Entwicklung der Transplantate	33
6.2.2.	Mikrovaskuläres Netzwerk	34
6.2.3.	Mikrohämodynamik	35
6.2.4.	Histologie und Immunhistochemie	36
6.3.	Einfluss des selektiven Cyclooxygenase-2-Inhibitors NS398	37
6.3.1.	Entwicklung der Transplantate	37
6.3.2.	Mikrovaskuläres Netzwerk	37
6.3.3.	Mikrohämodynamik	38
6.3.4.	Western Blot	39
6.3.5.	Histologie	39

6.4.	Einfluss des Immunsuppressivums Rapamycin	41
6.4.1.	Entwicklung der Transplantate	41
6.4.2.	Mikrovaskuläres Netzwerk	41
6.4.3.	Mikrohämodynamik	42
6.4.4.	Aorten-Ring-Assay	43
6.4.5.	Western Blot	44
6.4.6.	Histologie und Immunhistochemie	45
6.5.	Zusammenfassung der Ergebnisse	45
7.	Diskussion	48
7.1.	Diskussion von Material und Methodik	48
7.1.1.	Diskussion des Modells	48
7.1.2.	Diskussion der Untersuchungstechniken	51
7.2.	Diskussion der Ergebnisse	52
7.2.1.	Bedeutung von Hormonstatus und Endometrium-Fragmentgröße	52
7.2.2.	Bedeutung der pro-angiogenen Faktoren VEGF, FGF und PDGF	54
7.2.3.	Einfluss des selektiven Cyclooxygenase-2-Inhibitors NS398	55
7.2.4.	Einfluss des Immunsuppressivums Rapamycin	57
7.2.5.	Schlussfolgerungen und klinische Perspektiven	59
8.	Literaturverzeichnis	60
9.	Dank	75
10.	Lebenslauf	76
11.	Publikationen	78

1. Zusammenfassung

Die Endometriose ist eine der häufigsten gynäkologischen Krankheiten von Frauen im geschlechtsreifen Alter. Es handelt sich dabei um eine chronische, gutartig verlaufende Erkrankung, die bei bis zu 50% aller infertilen Patientinnen als Ursache angesehen werden kann. Trotz ihrer Häufigkeit wird sie eher selten oder sehr spät aufgrund ihrer unspezifischen Symptomatik diagnostiziert. Dabei leiden die Patientinnen vor allem an chronischen Unterbauchschmerzen. Histopathologisch ist die Endometriose definiert durch das Vorhandensein von funktionsfähigem Endometrium außerhalb der Gebärmutter, welches durch retrograde Menstruation in die Bauchhöhle gelangen kann.

Inwieweit die Angiogenese, d.h. die Entwicklung neuer Blutgefäße eine wichtige Voraussetzung für das dauerhafte Überleben des versprengten Endometriums in der Bauchhöhle ist, ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Aus diesem Grund war es das Ziel der vorliegenden Studie, ein neues Modell zur Untersuchung der Angiogenese in der Pathophysiologie und Therapie der Endometriose zu etablieren. Zu diesem Zweck wurden Endometrium-Fragmente aus dem Uterus von Syrischen Goldhamstern isoliert, die anschließend autolog in eine zuvor präparierte Rückenhautkammer transplantiert wurden. Auf diese Weise war es zum ersten Mal möglich, die einzelnen Schritte der Angiogenese in Endometrioseherden *in vivo* über einen Zeitraum von 14 Tagen repetitiv mit Hilfe der Technik der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie zu analysieren.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Angiogenese der transplantierten Endometrium-Fragmente in Abhängigkeit ihrer Größe (große und kleine Fragmente) und des Hormonstatus (unbehandelt, synchronisiert, ovariectomiert) untersucht. Dabei zeigte sich, dass der Blutfluss in den Gefäßen der größeren Herde erhöht war, was auf eine gesteigerte Aktivität schließen lässt. Des Weiteren führte die Unterbindung der endogenen Östrogenausschüttung durch bilaterale Ovariectomie zu einer verzögerten Angiogenese und signifikant erniedrigten Blutflüssen. Damit wird die essentielle Bedeutung ovarieller Östrogene auf die Vaskularisierung und Durchblutungsrate von Endometrioseherden deutlich.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss der pro-angiogenen Wachstumsfaktoren VEGF, FGF und PDGF auf die Angiogenese von Endometrioseherden analysiert. Hierbei führte die selektive Hemmung des Angiogenesefaktors VEGF nur zu einer geringen Abnahme der Gefäßdichte in Endometrioseherden, während die kombinierte Inhibition von VEGF, FGF und PDGF die Entwicklung neuer Blutgefäße und deren Ausreifung deutlich blockierte.

In einem weiteren Abschnitt der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Applikation des Cyclooxygenase-2-Inhibitors NS398 zu einer Regression von Endometrioseherden führt.

Dies kann einerseits auf eine anti-angiogene Wirkung von NS398 zurückgeführt werden. So war die Kapillardichte in NS398-behandelten Endometrioseherden im Vergleich zu Kontrollen deutlich verringert, was mit einer reduzierten VEGF Expression einherging. Zusätzlich führte die Inhibition der Cyclooxygenase-2 zu vermehrter Apoptose und reduzierter Proliferation in den Endometrioseherden. Aus diesem Grund könnte die Behandlung von Endometriose-Patientinnen mit Cyclooxygenase-2-Inhibitoren einen vielversprechenden Behandlungsansatz darstellen.

Schließlich wurde in der Arbeit die Wirkung von Rapamycin auf Endometrioseherde analysiert. Die Behandlung mit diesem Immunsuppressivum führte ebenfalls zu einer Regression der Herde, was erneut mit einer Inhibition der Angiogenese einherging. So waren die Kapillardichte und die VEGF Expression in den behandelten Herden im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert. Zusätzlich wurde die Zellproliferation gehemmt. Diese Ergebnisse zeigen, dass Rapamycin in Zukunft neben seiner immunsuppressiven Wirkung durchaus auch als ein potentieller Angiogenese-Inhibitor in der Therapie der Endometriose eingesetzt werden könnte.

Zusammenfassend konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein neues Endometriose-Modell etabliert werden, das es erstmals möglich macht, die Angiogenese in Endometrioseherden repetitiv *in vivo* zu analysieren. Es eignet sich hervorragend, neue Erkenntnisse zur Pathophysiologie der Erkrankung zu gewinnen und neue anti-angiogene Therapiestrategien in der Behandlung der Endometriose zu entwickeln.

2. Summary

Endometriosis is one of the most frequent gynecological diseases of women in the reproductive age. It is a chronic, benign disease, which affects up to 50% of all patients suffering from infertility. Despite its high incidence, endometriosis is often diagnosed relatively late due to its unspecific pathology. Most often, patients suffer from chronic pelvic pain. Endometriosis is histopathologically defined as the presence of functional endometrium outside the uterus, which enters the peritoneal cavity by retrograde menstruation.

Angiogenesis, i.e. the development of new blood vessels, represents a major prerequisite for the long-term survival of the ectopic endometrium inside the peritoneal cavity. Therefore, the aim of the present study was to establish a new model for the analysis of angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis. For this purpose, endometrial fragments were isolated from the uterus of Syrian golden hamsters. Subsequently, they were transplanted autologously into a dorsal skinfold chamber. In doing so, it was possible to repetitively analyze *in vivo* the individual steps of the angiogenic process in endometriotic lesions over a time period of 14 days by means of intravital fluorescence microscopy.

In the first part of this work, angiogenesis of transplanted endometrial fragments was analyzed depending on their size (small *versus* large) and the hormonal stage of the animals (untreated *versus* synchronized *versus* ovariectomized). Thereby, we could show that blood perfusion was increased in blood vessels of larger lesions, indicating an enhanced activity. Moreover, inhibition of endogenous estrogen release by bilateral ovariectomy resulted in a delayed angiogenesis with a significantly reduced blood flow within the lesions. This demonstrates the essential role of ovarian estrogens for the vascularization and blood perfusion of endometriotic lesions.

In the second part of this work, we analyzed the effect of the pro-angiogenic growth factors VEGF, FGF and PDGF on the angiogenic process of endometriotic lesions. Interestingly, we found that the selective blockade of the pro-angiogenic factor VEGF resulted only in a slightly decreased microvessel density within endometriotic lesions, whereas the combined inhibition of VEGF, FGF and PDGF could effectively inhibit the development of new blood vessels and their maturation.

In another part of this work, it could be shown that the application of the selective cyclooxygenase-2-inhibitor NS398 results in the regression of endometriotic lesions. On the one hand, this may be due to the anti-angiogenic effect of NS398. Accordingly, microvessel density in NS398-treated endometriotic lesions was significantly decreased when compared

to controls, which was associated with a reduced expression of VEGF. Furthermore, inhibition of cyclooxygenase-2 induced apoptotic cell death and reduced cell proliferation in endometriotic lesions. Therefore, treatment of patients suffering from endometriosis with cyclooxygenase-2-inhibitors may represent a promising therapeutic approach.

Finally, we analyzed the effect of rapamycin on endometriotic lesions. Treatment with this immunosuppressive drug also resulted in the regression of the lesions, which again was associated with an inhibition of angiogenesis. This was reflected by a significantly reduced microvessel density and VEGF expression in rapamycin-treated lesions when compared to controls. Moreover, cell proliferation was inhibited. These results suggest that besides its indication as an immunosuppressive drug, rapamycin might be used as a potential angiogenesis inhibitor in the future therapy of endometriosis.

In summary, a new endometriosis model was established, which allows for the first time to repetitively analyze *in vivo* the angiogenesis in endometriotic lesions. Therefore, this model has to be considered ideal to gain new insights in the pathophysiology of endometriosis and to develop new anti-angiogenic therapeutic strategies for the treatment of this frequent disease.

3. Einleitung

Die Endometriose stellt zur Zeit eine der häufigsten gutartigen Erkrankungen in der Gynäkologie dar. Etwa 10-15% der Frauen im geschlechtsreifen Alter sind davon betroffen. Die Patientinnen leiden an Dysmenorrhoe, Dyspareunie sowie zyklischen Unterbauchschmerzen. Des Weiteren führt die Erkrankung in vielen Fällen zur Unfruchtbarkeit [Rawson, 1991]. Daraus resultiert für die betroffenen Frauen oft ein hoher Leidensdruck. Daneben verursacht die Endometriose jährlich erhebliche Kosten im Gesundheitssystem aufgrund häufiger Krankenhausaufenthalte der Patientinnen, zahlreicher Operationen und teurer medizinischer Therapie.

Pathologisch-anatomisch wird die Endometriose durch den Nachweis des ektopen Wachstums von endometrialen Drüsen- und Stromazellen außerhalb des Uterus definiert [Galle, 1989]. Man unterscheidet drei Formen der Endometriose, die „Endometriosis genitalis externa“ (ektope Endometrioseherde in den Organen des kleinen Beckens wie Ovarien und Darm), die „Endometriosis genitalis interna“ (Endometrioseherde im Myometrium der Gebärmutter) und die „Endometriosis extragenitalis“ (Endometrioseherde ausserhalb des kleinen Beckens wie Lunge und Gehirn).

Zur Entstehung der Endometriose werden verschiedene Theorien diskutiert. Schon zu Beginn des letzten Jahrhunderts beschrieb Meyer seine „Zölom-Metaplasie-Theorie“. Er ging davon aus, dass sich embryonales Zölomepithel unter bestimmten Bedingungen metaplastisch in Endometriumgewebe umwandelt [Meyer, 1919]. Auch Recklinghausen [1896] und Russel [1899] beschrieben, dass sich aus embryonalen Zellresten funktionelles Endometrium differenzieren kann. Halban sah die Streuung einzelner Endometriumzellen über Blut- und Lymphgefäße als möglichen Verbreitungsweg an [Halban, 1924]. Die zur Zeit jedoch am meisten akzeptierte und durch viele tierexperimentelle Arbeiten gestützte Theorie ist die Implantationstheorie von Sampson [1927]. Er postulierte, dass Endometriumgewebe während der Menstruation retrograd durch die Eileiter in die Peritonealhöhle gelangt und dort unter günstigen Bedingungen anwächst und proliferiert (*Abbildung 1*). Damit die Endometrioseherde auch außerhalb der Gebärmutter dauerhaft vital bleiben und mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden können, ist die Angiogenese, d.h. die Entstehung neuer Blutgefäße, eine wesentliche Voraussetzung [Shifren et al., 1996; Smith, 1997; Taylor et al., 1997].

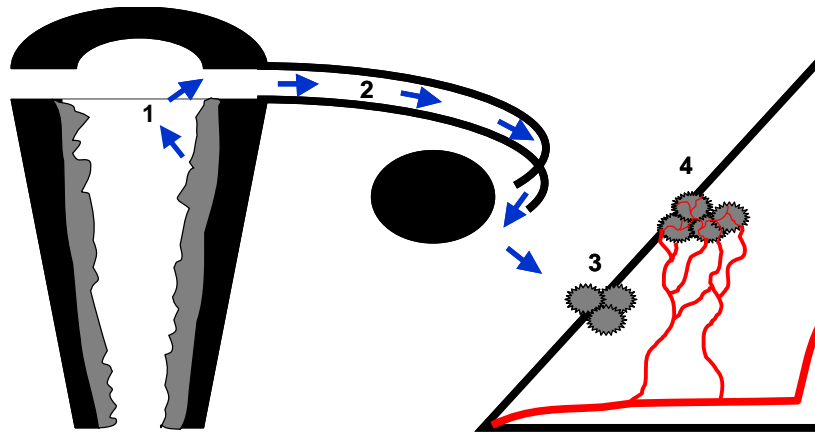


Abbildung 1: Entstehung von Endometrioseherden außerhalb des Uterus nach der Implantationstheorie von Sampson. Endometriumgewebe wird bei der Menstruation abgestoßen (1) und gelangt retrograd durch die Tuben (2) in die Peritonealhöhle, wo es am Peritoneum adhärirt (3) und Anschluss an das Blutgefäßsystem erlangt (4).

Die Angiogenese ist ein komplexer dynamischer Prozess, der durch die Abfolge verschiedener zellulärer Interaktionen gekennzeichnet ist [Risau 1997; Carmeliet 2000]. Durch Ausschüttung pro-angiogener Faktoren werden Endothelzellen von bereits bestehenden Blutgefäßen aktiviert und zur Proliferation stimuliert. Die Basalmembran der Gefäßwand wird abgebaut, so dass die Endothelzellen in Richtung des angiogenen Stimulus migrieren können. Infolge bilden sich Gefäßsprossen, die in das umliegende Bindegewebe wachsen. Aus ihnen entstehen tubuläre Gefäßstrukturen, in denen sich schließlich ein Lumen formt. Durch die Anlagerung von weiteren Zellen wie Perizyten und Fibroblasten erfolgt dann die Stabilisierung der Gefäßwand (Abbildung 2).

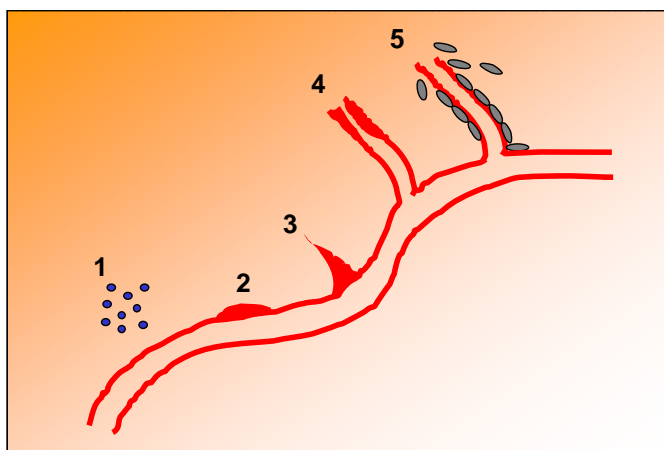


Abbildung 2: Die Entstehung eines neuen Blutgefäßes erfolgt in charakteristischen Entwicklungsstadien: Stimulation vorhandener Gefäße durch Wachstumsfaktoren (1), Proliferation der Endothelzellen und Abbau der Basalmembran (2), Ausbildung von Gefäßsprossen (3), Formation eines Lumens (4) und Anlagerung wandstabilisierender Zellen (5).

Die Angiogenese spielt sowohl bei vielen physiologischen Vorgängen im weiblichen Reproduktionstrakt wie z.B. beim ovariellen Zyklus [Reynolds et al. 1992; Augustin et al., 1995] als auch bei pathologischen Vorgängen wie z.B. bei der Wundheilung [Polverini et al., 1977; Greenburg und Hunt, 1978; Banda et al., 1982] sowie bei Tumorwachstum und Me-

tastasierung [Folkman, 1985; Folkman, 1995] eine wesentliche Rolle. Aus der Tumorbilogie ist bekannt, dass die Entwicklung neuer Blutgefäße einem Gleichgewicht angiogener Stimulatoren und Inhibitoren unterliegt [Hanahan und Folkman, 1996]. In den vergangenen Jahrzehnten konnte eine Vielzahl dieser pro- und anti-angiogenen Faktoren identifiziert werden (*Tabelle 1*).

Pro-angiogene Faktoren	Anti-angiogene Faktoren
<p>Angiogenin Angiopoetin-1 Developmental Endothelial Locus-1 (Del-1) Acid Fibroblast Growth Factor (aFGF) Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) Follistatin Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G- CSF) Hepatocyte Growth Factor (HGF) Interleukin-3 (IL-3) Interleukin-8 (IL-8) Leptin Midkine Placental Growth Factor (PIGF) Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor (PD-ECGF) Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) Pleiotropin (PTN) Proliferin Transforming Growth Factor-alpha (TGF-alpha) Transforming Growth Factor-beta (TGF-beta) Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-alpha) Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)</p>	<p>Angiostatin (Plasminogen Fragment) Antiangiogenic Antithrombin III Cartilage-Derived Inhibitor (CDI) CD59-Complement Fragment Endostatin (Collagen XVIII Fragment) Fibronectin Fragment Gro-beta Heparinasen Heparin Hexasaccharide Fragment Human Chorionic Gonadotropin (HCG) Interferon alpha, beta, gamma Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) 2-Methoxyestradiol Placental Ribonuclease Inhibitor Plasminogen Activator Inhibitor Platelet Factor 4 (PF4) Prolactin 16kD Fragment Retinoids Tetrahydrocortisol-S Thrombospondin-1 (TSP-1) Transforming Growth Factor beta (TGF beta) Vasculostatin Vasostatin (Calreticulin Fragment)</p>

Tabelle 1: Wichtige bisher identifizierte pro- und anti-angiogene Wachstumsfaktoren mit Abkürzung (in alphabetischer Reihenfolge).

Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene pro-angiogene Faktoren auch in der Pathogenese der Endometriose eine wichtige Rolle spielen. So wird die Entwicklung neuer Blutgefäße in Endometrioseherden durch VEGF stimuliert [McLaren et al., 1996], einer der potentesten pro-angiogenen Faktoren. Frauen, die an Endometriose erkranken, weisen deutlich höhere VEGF Werte in der Peritonealflüssigkeit auf [Shifren et al., 1996]. Shifren et al. [1996] konnten in diesem Zusammenhang auch nachweisen, dass Endometrioseherde bei milden Verlaufsformen der Erkrankung eine geringere VEGF Expression aufweisen als bei schweren Krankheitsverläufen.

Zusätzlich wurden inzwischen zahlreiche andere pro-angiogene Faktoren in der Pathogenese der Endometriose nachgewiesen. Zu ihnen zählen Relaxin [Unemori et al., 1999],

Fibroblast Growth Factor [Ferriani et al., 1993], Interleukin-8 [Iwabe et al., 1998], die Matrix-metalloproteinasen-2 und -9 [Ueda et al., 2002], Hepatocyte Growth Factor [Osuga et al., 1999; Khan et al., 2006], Erythropoietin [Matsuzaki et al., 2001b], Endometriosis Protein-1 [Sharpe et al., 1993], VEGF [Donnez et al., 1998] sowie Adrenomedullin [Nikitenko et al., 2000], Interleukin-1 [Lebovic et al., 2000], Epidermal Growth Factor [Sandberg et al., 2001], Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Faktor [Fujimoto et al., 1999] und Angiogenin [Suzumori et al., 2004]. Außerdem ist bekannt, dass Endometrioseherde schneller anwachsen, je besser die Durchblutung des umgebenden Gewebes ist und dass die dichter vaskularisierten Herde auch die aktiveren sind [Vernon und Wilson, 1985]. Dabei sind die frühen Stadien der Endometrioseherde durch ihre rötliche Färbung charakterisiert und werden daher auch als „red lesions“ bezeichnet. Donnez et al. [1998] konnte in diesen Stadien in der frühen sekretorischen Zyklusphase eine signifikant höhere VEGF Expression und Gefäßdichte nachweisen. Spätere Stadien, auch als „black lesions“ bezeichnet, weisen im Unterschied dazu niedrigere Gefäßdichten aber dafür höhere Gefäßdurchmesser auf [Nisolle et al., 1993; Matsuzaki et al., 2001a].

Aufgrund dieser Ergebnisse wird die Endometriose inzwischen zu der Gruppe der angiogenen Erkrankungen gezählt, zu der auch Krebs gehört. Aus der Krebsforschung ist bekannt, dass Tumorzellen und aktivierte Zellen in ihrer Umgebung in der Lage sind, verschiedene pro-angiogene Substanzen zu bilden [Bicknell und Harris, 2004]. Obwohl die Endometriose nicht zu den malignen Erkrankungen zählt, weist sie einige Charakteristika eines malignen Phänotyps auf. Für das Wachstum von ektopem Endometrium sind die Adhäsion und die Invasion von Epithel mit gleichzeitiger Gewebedestruktion eine Voraussetzung [Kobayashi, 2000]. Fernabsiedlung und Multifokalität von Endometriumgewebe sind klinisch nachweisbar [Ueki, 1991]. Ein direkter Zusammenhang zwischen Endometriose und der Entstehung von klarzelligen Ovarialkarzinomen wurde inzwischen ebenfalls beschrieben [Tamura et al., 1998; Yoshikawa et al., 2000]. Entsprechend könnte eine anti-angiogene Therapie, wie sie heute schon in der Onkologie zur Behandlung von Tumoren eingesetzt wird, eine alternative Behandlungsstrategie bei der Endometriose darstellen.

Da die Endometriose eine östrogenabhängige Erkrankung ist, ist neben der chirurgischen Entfernung der Herde die Therapie der Wahl zur Zeit die Reduktion der endogenen Östrogenausschüttung. Hier kommen GnRH-Analoga, Gestagene oder orale Kontrazeptiva zum Einsatz [Ryan and Taylor, 1997; Grio et al., 1997; Kaminski et al., 2001; Vercellini et al., 2007]. Die Applikation dieser Medikamente zur Reduktion der Östrogenausschüttung und zur Unterbindung der Endometriose-assoziierten Schmerzen ist zwar sehr effektiv [Moghissi, 1999; Nothnick und D’Hooghe, 2003], bietet jedoch keinen kausalen Therapieansatz, so

dass hierbei eine klinische Rezidivrate von bis zu 50% beschrieben ist [Becker et al., 2004]. Außerdem können diese Medikamente eine Vielzahl von Nebenwirkungen wie Gewichtszunahme, Hitzewallungen, depressive Verstimmungen oder iatrogen induzierte Osteoporose hervorrufen [Sagsveen et al., 2003].

Durch neue anti-angiogene Therapieformen könnten die Nebenwirkungen anti-hormoneller Behandlungsmethoden gegebenenfalls vermieden werden. Hierzu ist es jedoch notwendig zu klären, welche Rolle verschiedene pro-angiogene Wachstumsfaktoren in der Pathogenese der Endometriose spielen, um gegebenenfalls die Effektivität einer anti-angiogenen Therapie durch die kombinierte Blockade mehrerer relevanter Wachstumsfaktoren zu verbessern. Daneben sollte geklärt werden, ob anti-angiogene Substanzen, welche bereits in verschiedenen Tumormodellen vielversprechende Ergebnisse lieferten, nicht auch in Endometrioseherden die Entwicklung neuer Blutgefäße reduzieren können. Hierzu zählen die selektiven Angiogenese-Inhibitoren SU5416 [Fong et al., 1999] und SU6668 [Mendel et al., 2000; Hoeckman, 2001]. Außerdem konnte für bereits etablierte Medikamente mit den verschiedensten Wirkansätzen zusätzlich eine anti-angiogene Wirkung nachgewiesen werden. Vertreter aus dieser Gruppe sind die Cyclooxygenase-2-Inhibitoren [Tuettenberg et al., 2005], die hauptsächlich analgetisch und anti-entzündlich wirken, und Rapamycin [Bruns et al., 2004], welches als Immunsuppressivum eingesetzt wird.

Um die genaue Rolle bestimmter pro-angiogener Wachstumsfaktoren in der Pathogenese der Endometriose bzw. die Effektivität anti-angiogener Substanzen zur Behandlung dieser Erkrankung analysieren zu können, werden geeignete tierexperimentelle Modelle benötigt. Aus diesem Grund, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, ein neues tierexperimentelles Endometriose-Modell zu etablieren, was es zum ersten Mal erlaubt, die Entwicklung neuer Blutgefäße in ektopem, transplantiertem Endometrium direkt zu visualisieren und schrittweise zu untersuchen, um so die Wirkungen verschiedener anti-angiogener Substanzen auf Endometrioseherde analysieren zu können.

Als Empfängergewebe für das transplantierte Endometrium diente die freipräparierte, quergestreifte Skelettmuskulatur in der Rückenhautkammer des Syrischen Goldhamsters [Endrich et al., 1980]. Mit diesem Tiermodell ist es möglich, unter Verwendung der Technik der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie die Ausbildung neuer Gefäßnetzwerke in Endometrioseherden über einen Zeitraum von 14 Tagen *in vivo* qualitativ und quantitativ zu untersuchen. Wichtige Parameter zur Quantifizierung der Angiogenese sind hierbei Netzwerkgröße, funktionelle Kapillardichte, Durchflussschwindigkeit und Durchmesser von neugebildeten Kapillaren. Histologische, immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchun-

gen geben zusätzlich Aufschluss über die Gewebemorphologie der Transplantate innerhalb der Rückenhautkammer, die Funktionalität verschiedener Zellkomponenten und die Expression angiogener Wachstumsfaktoren, sowie Proliferations- und Apoptosemarker.

4. Ziel der Studie

Das Ziel der vorliegenden experimentellen Arbeit war es, ein leicht reproduzierbares Modell zur Untersuchung der Angiogenese in Endometrioseherden zu etablieren. Hierzu wurden isolierte Endometrium-Fragmente autolog in die Rückenhautkammer Syrischer Goldhamster transplantiert.

Die folgenden Fragestellungen sollten auf diese Weise näher analysiert werden:

1. Welchen Einfluss hat die Größe der isolierten Endometrium-Fragmente auf die Entwicklung neuer Blutgefäße in den erzeugten Endometrioseherden?
2. Welchen Einfluss hat eine bilaterale Ovariectomie auf die Entwicklung neuer Blutgefäße in den erzeugten Endometrioseherden?
3. Welche Bedeutung kommt den pro-angiogenen Wachstumsfaktoren VEGF, FGF und PDGF bei der Angiogenese von Endometrioseherden zu?
4. Kann durch den selektiven Cyclooxygenase-2-Inhibitor NS398 die Angiogenese in Endometrioseherden gehemmt werden?
5. Kann durch das Immunsuppressivum Rapamycin die Angiogenese in Endometrioseherden gehemmt werden?

5. Material und Methodik

5.1. Versuchstiere

Alle Untersuchungen wurden an weiblichen Syrischen Goldhamstern mit einem Körpergewicht von ca. 80g durchgeführt. Sowohl die Spender- als auch die Empfängertiere befanden sich in einem geschlechtsreifen Alter von ca. 8-10 Wochen. Die Tiere stammten aus eigener Inzucht (Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar) und wurden unter klimatisierten Bedingungen mit einem 12stündigen Tag-/Nacht rhythmus gehalten. Während der Versuche waren die Tiere in Einzelkäfigen untergebracht und erhielten freien Zugang zu Standardlaborfutter (Altromin, Lage) und Trinkwasser *ad libitum*.

Die Tierversuche waren gemäß dem Tierschutzgesetz durch das Landratsamt der Stadt Homburg/Saar genehmigt.

5.2. Modell

5.2.1. Mikrozirkulationsmodell Rückenhautkammer

Zur Untersuchung der Angiogenese in Endometrioseherden wurde das Modell der Rückenhautkammer des Syrischen Goldhamsters (*Mesocricetus auratus*) gewählt. Die Rückenhautkammerpräparation besteht aus quergestreifter Muskulatur, subkutanem Gewebe und Haut. Mit diesem Modell, erstmals 1980 von Endrich et al. am Hamster beschrieben [Endrich et al., 1980], können verschiedene mikrozirkulatorische Parameter am wachen Versuchstier über einen Zeitraum von 2-3 Wochen untersucht werden. Durch die intravenöse Gabe von Fluoreszenzfarbstoffen ist es möglich, mittels Fluoreszenz-Auflicht-Mikroskopie die gesamte Mikrozirkulation der freipräparierten Rückenhautmuskulatur und der in der Kammer befindlichen Gewebetransplantate darzustellen und so den Prozess der Angiogenese schrittweise zu verfolgen. Die mikroskopischen Bilder werden auf Videoband aufgezeichnet und können nach Beendigung des Versuchs durch ein entsprechendes Bildverarbeitungssystem quantifiziert werden.

5.2.2. Implantation der Rückenhautkammer

Für die Implantation der Rückenhautkammer wurde das Versuchstier durch intraperitoneale Injektion von Pentobarbital (50mg/Kg KG; Narcoren, Merial, Hallbergmoos) narkotisiert, anschließend die gesamte Rückenpartie rasiert (Elektra II GH204, Aesculap, Tuttlingen) und

danach noch vorhandene Behaarung durch chemische Depilation (Plica med Creme, Asid Bonz, Böblingen) vollständig entfernt. Nach der Reinigung der enthaarten Körperpartie mit warmen Wasser und der Desinfektion mit 70%igen Alkohol konnte mit der eigentlichen Präparation begonnen werden. Hierzu wurde das Versuchstier in Bauchlage gebracht und an zwei Haltefäden entlang der Rückenmittellinie aufgespannt. Auf diese Weise konnte unter Gegenlichtkontrolle der rückwärtige Teil der Rückenhautkammer, die aus zwei symmetrischen Titan-Rahmen besteht (*Abbildung 3*), entlang des Oberrandes der Hautfalte mit 5.0 Seide-Nähten angebracht werden. Zur Fixierung des vorderen Rahmens wurden anschließend zwei kleine Inzisionen an der Hautfaltenbasis präpariert, wobei darauf geachtet wurde, dass dabei die zwei Hauptgefäßstämme der Rückenhaut nicht verletzt wurden. Durch die beiden Inzisionen konnten dann die Verbindungsschrauben des hinteren Titanrahmens durch die Rückenhautfalte nach vorne geführt werden, die dort zunächst mit zwei Klemmen fixiert wurden. Danach wurden die Haltefäden entfernt und das Tier in Seitenlage gebracht. Unter einem Operationsmikroskop (Wild M650; Leitz, Schweiz) schloss sich die mikrochirurgische Entfernung der vorderseitigen Hautschicht mit zugehöriger Subkutis, der quergestreiften Unterhautmuskulatur, sowie der beiden Schichten des Retraktormuskels in einem kreisrunden Bereich von ca. 15mm an.

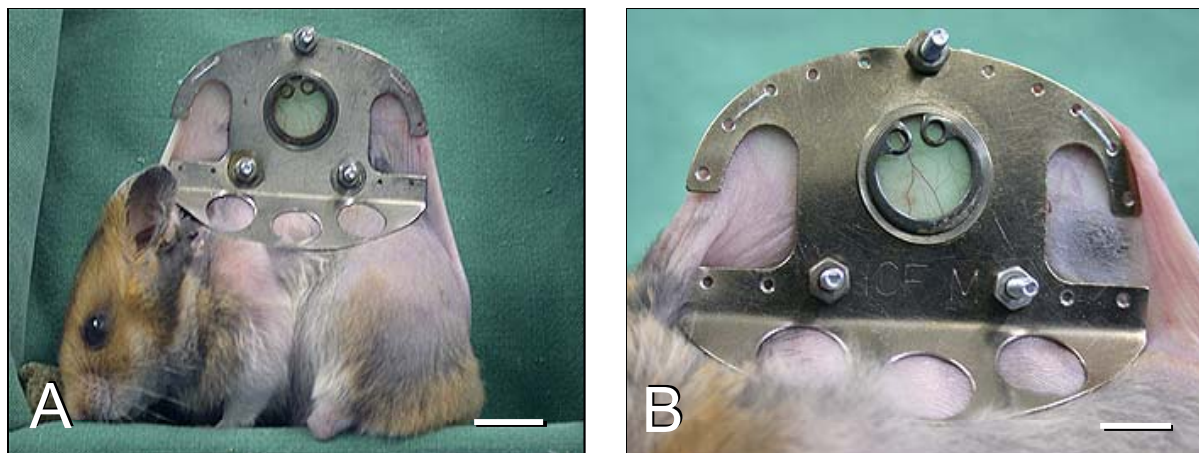


Abbildung 3: A: Aufnahme einer präparierten Titankammer auf dem Rücken eines Syrischen Goldhamsters. B: Nahaufnahme der Rückenhautkammer (A: – 1,4mm; B: – 0,8mm).

Dabei wurde die Größe des eigentlichen Beobachtungsfensters der Kammer (Durchmesser 11mm) absichtlich überschritten, um eine Gewebekompression und damit eine Beeinträchtigung der Blutversorgung nach Anbringen des vorderen Rahmens zu vermeiden. Nach Spülung der verbliebenen Schichten, bestehend aus der gegenüberliegenden quergestreiften Hautmuskulatur, Subkutis und Haut, mit steriler Kochsalzlösung, wurde der vorderseitige Kammerrahmen auf die Verbindungsschrauben gesetzt und mit Muttern fixiert. Anschließend konnte das Deckglas des Beobachtungsfensters durch Adhäsion auf den freipräparier-

ten Hautmuskel aufgebracht und mit einem Sprengring im vorderseitigen Kammerrahmen fixiert werden.

Abschließend wurde der vordere Rahmen an seinen dafür vorgesehenen Fixationsbohrungen mittels 5.0 Seiden-Nähten an der Hautfalte angenäht. Nach Beendigung der Präparation wurden die Tiere wieder in ihren Käfig gelegt und konnten sich dort für 48 Stunden von der Anästhesie und dem chirurgischem Trauma erholen. Die Tiere tolerierten die Rückenhautkammer sehr gut, was sich an einer normalen Aktivität und Nahrungsaufnahme zeigte.

5.2.3. *Hormonelle Synchronisierung*

Weibliche Hamster weisen unter physiologischen Bedingungen einen regelmäßigen 4-Tages-Zyklus auf. Die Geschlechtsreife tritt in einem Alter von 6-8 Wochen ein. Daher eignete sich der Hamster für die vorliegende Studie als Versuchstier sehr gut. Um zu gewährleisten, dass sich für die Versuche alle Tiere einer Untersuchungsgruppe im gleichen Zyklusstadium befanden, wurden die Tiere zunächst hormonell synchronisiert. Dadurch befanden sich alle Tiere zum Zeitpunkt der Entnahme und Transplantation des Endometriums im Östrus.

Die hormonelle Synchronisierung erfolgte nach der Methode von Groß [1977] durch zwei subkutane Injektionen von Östradiol (55µg/kg KG) im Abstand von 24 Stunden. Wiederum 20 Stunden später erhielten die Tiere Progesteron (7,5mg/kg KG) subkutan appliziert. Durch diese Injektion wurde der erste Östrus iatrogen induziert. 4 Tage später setzte der erste natürliche Östrus ein.

5.2.4. *Isolierung von Endometrium*

Nagetiere haben im Gegensatz zu Säugetieren einen *Uterus duplex*, d.h. sie besitzen einen getrennt angelegten Uterus mit zwei Uterushörnern. Dies ermöglicht eine Wurfgröße von ca. 5-15 Jungtieren. In der vorliegenden Studie wurde bei allen Versuchstieren standardisiert nur Endometrium aus dem rechten Uterushorn isoliert und transplantiert, um den operativen Zugangsweg auf eine Mindestgröße zu reduzieren und so die Tiere möglichst wenig zu belasten.

Der Zugang zur Bauchhöhle erfolgte median über die Linea alba. Dafür wurde das Versuchstier mit Pentobarbital (50mg/kg KG) narkotisiert und der Bauch rasiert. Nach Desinfektion der Haut mit 70%igem Alkohol wurde ein Bauchschnitt von ca. 6mm in der Linea alba durchgeführt. Mit Hilfe eines Stereo-Operationsmikroskops (Wild M650; Leitz, Schweiz) wurde dann das rechte Uterushorn mit Tube und Ovar identifiziert und zur Präparation aus dem Bauch ausgelagert. Nach Setzen von Ligaturen am distalen und proximalen Ende des Uterushornes konnte dieses unter Blutstillung mittels Elektrokauter entnommen werden. An-

schließlich wurde der Bauch mit physiologischer Kochsalzlösung gespült und die mediane Laparotomie mittels 5.0 Seide-Faden in fortlaufender Naht wieder verschlossen. Der gesamte Eingriff dauerte nur wenige Minuten.

Das isolierte Uterushorn wurde in eine Petrischale transferiert (*Abbildung 4*). Sie enthielt neben 37°C warmen Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (10% Fetales Kälberserum; 0,1mg/mL Gentamycin), den Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid (H33342; 200mg/ml; Molekulargewicht (MG) 562, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) zur Chromatinfärbung. Zur Isolierung des Endometriums wurde das Uterushorn unter dem Stereo-Operationsmikroskop zunächst in Längsrichtung mittels einer Mikroschere aufgeschnitten und dann auf einer kleinen Korkplatte aufgespannt. Auf diese Weise war es möglich, vorsichtig Myometrium-freie Endometrium-Fragmente unterschiedlicher Größe aus dem Uterushorn zu isolieren. Diese wurden in eine zweite Bisbenzimid-freie Petrischale mit DMEM überführt, wo sie in Gewebefragmente vergleichbarer Größe (0,1mm² bzw. 0,5mm²) geschnitten wurden.

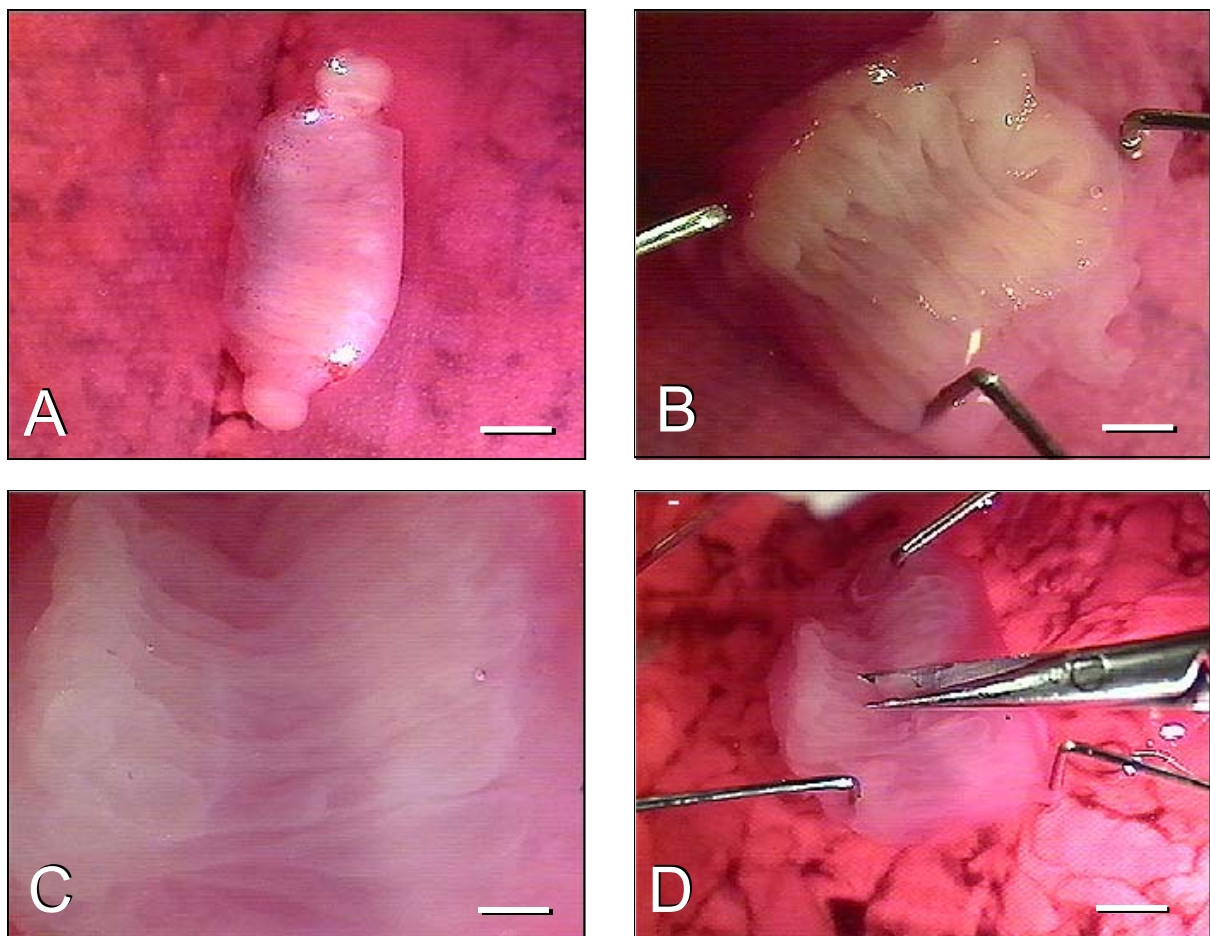


Abbildung 4: Lichtmikroskopische Aufnahmen eines isolierten Uterushorns (A). Nach longitudinaler Eröffnung des Horns kann das Endometrium gut identifiziert werden (B,C). Dieses wird in einem weiteren Schritt mittels einer Mikroschere vorsichtig vom Myometrium abpräpariert (D). (A: – 2mm; B: – 1,6mm; C: – 1,0mm; D: – 2mm).

5.2.5. Transplantation von Endometrium

Zur autologen Transplantation von Endometrium wurden die Tiere mit Rückenhautkammer in eine speziell konstruierte Plexiglasröhre gelegt, die auf einer Plexiglasbühne fixiert werden konnte. Dies ermöglichte den freien Zugang und die optimale seitliche Lagerung der Rückenhautkammer zur Transplantation. Hierzu wurde der Sprengring des Beobachtungsfensters entfernt, das Deckglas gelöst und das Kammergewebe zunächst mit physiologischer Kochsalzlösung gespült. Nun wurden unter operationsmikroskopischer Sicht vier zuvor isolierte Endometrium-Fragmente des gleichen Tieres auf die quergestreifte Hautmuskulatur platziert. Anschließend wurde die Kammer mit einem neuen Deckglas und dem Sprengring wieder verschlossen.

5.2.6. Ovariectomie

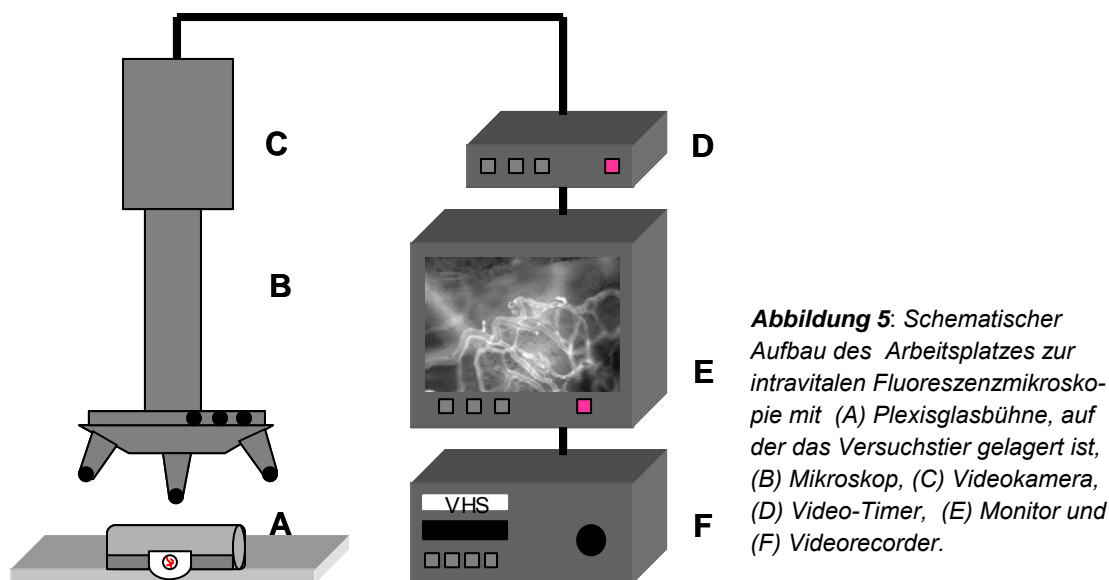
Um in der vorliegenden Arbeit den Einfluss des ovariellen Steroidhormons Östrogen auf die Angiogenese in Endometrioseherden näher untersuchen zu können, wurde in einer Versuchsgruppe eine bilaterale Ovariectomie durchgeführt. Dafür wurden die Tiere nach intraperitonealer Injektion von Pentobarbital (50mg/kg KG) in der Rückenlage fixiert. Der Bauch wurde zuvor rasiert, gewaschen und mit 70%igem Alkohol desinfiziert. Dann erfolgte die Eröffnung des Bauches median in der Linea alba. Mittels Operationsmikroskop wurden zuerst das rechte Uterushorn und das rechte Ovar dargestellt. Die Arteria und Vena ovarica dextra wurden mittels 4.0 Polyethylene-Faden ligiert. Kleinere Anastomosen zwischen Ovar und Tube bzw. Ovar und Uterus konnten durch Elektrokauterisation verschlossen werden. Nach vollständiger Unterbindung des Blutflusses konnte das Ovar *in toto* entnommen werden. Auf gleiche Weise wurde die Entfernung des linken Ovars durchgeführt. Schließlich erfolgte die Spülung des Bauchraumes mit physiologischer Kochsalzlösung und ein Wundverschluss der Operationswunde mittels 5.0 Seide-Faden in fortlaufender Naht. Die Tiere konnten sich anschließend für 1 Woche von dem Eingriff erholen, bevor die eigentlichen Transplantationsversuche durchgeführt wurden.

5.3. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Zur Durchführung der intravitale Fluoreszenzmikroskopie erhielten die Tiere am Tag der Transplantation sowie am 2., 4., 7., 10. und 14. Tag eine intraperitoneale Injektion mit Pentobarbital (50mg/kg KG) zur Anästhesie. Anschließend erfolgte die retrobulbäre Injektion der Fluoreszenzfarbstoffe 5%Fluoreszein-Isothiocyant-markiertes Dextran (FITC-Dextran; 0,1ml i.v.; MG: 150.000 D; Sigma), welches zur Kontrastverstärkung durch die Anfärbung des Blutplasmas benutzt wurde, und Rhodamin-6G (0,1ml i.v.; 0,1%; MG: 479; Sigma), mit dem *in*

vivo die Leukozyten markiert werden konnten. Beide Farbstoffe wurden hierzu im Verhältnis 1:1 gemischt.

Zum Mikroskopieren wurden die Tiere in einer Plexiglasröhre immobilisiert. Die Rückenhautkammer wurde in horizontaler Lage auf einer Plexiglasbühne befestigt und unter das Mikroskop platziert. Die intravital Fluoreszenzmikroskopie erfolgte an einem modifizierten Leitz-Orthoplan-Mikroskop (Leitz GmbH, Wetzlar, Deutschland) mit Auf- und Durchlicht-Einrichtung. Für die Auflicht-Technik wurde eine 100W Quecksilber (HBO) Lichtquelle (Leitz) an ein Ploemo-Pak Illuminator System gekoppelt. Durch zwischengeschaltete Filterblöcke erfolgte eine Anregung und Filterung des Lichts mit verschiedenen Wellenlängen. Für Übersichtsaufnahmen wurden ein 4x Objektiv (Olympus; Graz, Österreich) und 6,3x Objektiv mit langem Arbeitsabstand (Zeiss; Jena, Deutschland) verwendet. Für die Detailaufnahmen der neugebildeten Gefäßnetzwerke innerhalb der Transplantate diente ein 10x und 20x Objektiv mit langem Arbeitsabstand (Zeiss; Jena, Deutschland). Zur Aufzeichnung wurde eine Charge-Coupled Device (CCD) Videokamera (CF8/1 FMC; Kappa Messtechnik GmbH, Gleichen, Deutschland) verwendet, welche die Aufnahme von 50 Halbbildern pro Sekunde ermöglichte. Über einen Videotimer (VTG 33, FOR-A; Japan), gekoppelt an ein Video-Recorder-System (Panasonic AG7350; Japan) wurden die Aufnahmen auf Videoband unter Vermerk der Versuchstiernummer und des Untersuchungszeitpunkts aufgezeichnet (*Abbildung 5*).



5.3.1. Mikrozirkulatorische Parameter

Die Auswertung der intravitalmikroskopischen Bilder erfolgte durch die quantitative Analyse verschiedener mikrozirkulatorischer Parameter off-line, d.h. nach Beendigung der Versuche mittels eines Computer-gestützten Bildverarbeitungssystems (CapImage; Dr. Zeintl Ingenieurbüro Heidelberg, Deutschland). Im 4x oder 6,3x Objektiv wurden die Größe der Trans-

plantate und die Fläche der neu entstandenen Gefäßnetzwerke ermittelt. Die funktionelle Kapillardichte der neu entstandenen Gefäße, ihre Durchmesser und die Blutzellgeschwindigkeit wurden im 20x Objektiv ausgewertet.

5.3.1.1. Fläche

Zur Messung der Transplantatgröße und der revaskularisierten Gewebeareale der transplantierten Endometrium-Fragmente wurden die entsprechenden Bereiche am Auswertebildschirm durch Umrandung markiert und durch Erfassung aller sich darin befindlichen Bildpunkte der Flächeninhalt in mm^2 bestimmt. Um hierzu die Endometrium-Fragmente vom Empfängergewebe der Rückenhautkammer abgrenzen zu können, wurden sie vor der Transplantation in DMEM mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid H33342 gefärbt (siehe auch 5.2.4.). Dieser markiert Zellkerne durch Anlagerung an die DNS, wobei die Fluoreszenz bei lebenden unfixierten Zellen über mehrere Zellgenerationen erhalten bleibt. Die revaskularisierte Fläche der Transplantate (in %) wurde an den einzelnen Versuchszeitpunkten als das Verhältnis zwischen der jeweils gemessenen mikrovaskulären Netzwerkfläche und der Transplantatgröße berechnet.

5.3.1.2. Funktionelle Kapillardichte

Die funktionelle Kapillardichte beschreibt die Länge der von Erythrozyten perfundierten Kapillaren pro Beobachtungsfeld. Ihre Messung erfolgte durch digitales Nachzeichnen der perfundierten Kapillaren am Live-Bild in einem definierten Beobachtungsareal. Der Quotient aus der Gesamtlänge der nachgezeichneten Kapillaren und der Fläche des Beobachtungsareals ergab die funktionelle Kapillardichte in cm/cm^2 .

5.3.1.3. Kapillardurchmesser

Zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten wurden jeweils 10 Durchmesser neu gebildeter Gefäße in den Transplantaten erfasst. Die Auswahl der Gefäße erfolgte standardisiert durch das Auflegen einer Folie auf den Auswertebildschirm, auf der ein Achsenkreuz gezeichnet war. Es wurden nur die Kapillaren gemessen, die entweder die vertikale oder die horizontale Linie dieses Achsenkreuzes schnitten. Aus diesen 10 Einzeldurchmessern wurde das arithmetische Mittel gebildet. Die Messung erfolgte in μm . Sie war dadurch möglich, dass der Plasma-Marker FITC-Dextran den Erythrozyten-freien Plasmasaum von Gefäßen darstellt, und damit durch die Auflicht-Fluoreszenz-Mikroskopie die Gefäßgrenzen erfasst werden konnten.

5.3.1.4. *Blutzellgeschwindigkeit*

Die Messung der Blutzellgeschwindigkeit erfolgte an den Gefäßen, an denen bereits der Durchmesser erfasst wurde. Sie erfolgte durch die computer-assistierte Line-Shift-Diagramm-Methode [Klyscz et al., 1997]. Nach dieser Methode wird eine zentral im Lumen gelegene Messlinie entlang der Blutflussrichtung definiert. Dann wird das Videoband für 10 Sekunden in Echtzeit abgespielt. Für jedes Halbbild wird dabei entlang der Messlinie ein Grauwertprofil erstellt und im Bildspeicher aufgezeichnet. Daraus erstellt der Computer dann ein Line-Shift-Diagramm, in dem helle und dunkle schrägverlaufende Linien zu erkennen sind, wenn sich während der Messung Plasmalücken bzw. Erythrozyten entlang der Messlinie bewegt haben. Aus der Steigung dieser Linien kann die Blutzellgeschwindigkeit in $\mu\text{m/s}$ errechnet werden.

5.3.1.5. *Mikrovaskulärer Blutfluss*

Aus der Blutzellgeschwindigkeit (v) und dem Gefäßdurchmesser (d) war es möglich, den mikrovaskulären Blutfluss individueller Mikrogefäße zu berechnen:

$$\text{Mikrovaskulärer Blutfluss} = \pi \times (d/2)^2 \times v/K$$

K steht hierbei für den sogenannten Baker-Wayland-Faktor [Baker und Wayland, 1974], der das parabole Geschwindigkeitsprofil des Blutes in Mikrogefäßen berücksichtigt.

Allgemein wird für die Berechnung des Blutflusses in größeren Gefäßen die Blutzellgeschwindigkeit einfach mit dem Gefäßquerschnitt multipliziert. In der vorliegenden Arbeit war dies aber nicht möglich, da hier Mikrogefäße mit parabolischem Geschwindigkeitsprofil analysiert wurden. Aus diesem Grund wurde der Korrekturfaktor (K) eingesetzt, der den Unterschied zwischen den gemessenen Blutzellgeschwindigkeiten im Zentralstrom und der durchschnittlichen Blutzellgeschwindigkeit ausgleicht. Entsprechend der hier analysierten Durchmessergrößen von $\sim 5\text{-}20\mu\text{m}$ wurde nach Lipowsky und Zweifach ein Faktor von 1,3 eingesetzt [1978].

5.4. Histologie

5.4.1. *Konventionelle Histologie*

Am Ende der jeweiligen Versuchsreihen wurden von den Empfängertieren exzidierte Rückenhautkammer-Präparationen in 4%-iger Formaldehydlösung bei 4°C für 24 Stunden fixiert. Nach der anschließenden Einbettung in Paraffin konnten Serienschnitte von $4\mu\text{m}$ Schnittdicke angefertigt werden.

Die Schnitte wurden mittels Hämatoxylin-Eosin nach Standardprotokoll gefärbt. Dabei färbt Hämatoxylin alle sauren/basophilen Strukturen blau an (DNA, Zellkern), während Eosin alle basischen/acidophilen Strukturen (Zellplasmaeiproteine) markiert. Die Schnitte wurden unter einem Lichtmikroskop (BX60 Olympus, Hamburg, Deutschland) analysiert. Zeigte ein solcher Schnitt einen Endometrioseherd, so wurde der vorherige und nachfolgende Schnitt für immunhistochemische Färbungen verwendet.

5.4.2. Immunhistochemie

Zur Darstellung proliferierender Zellen wurden Schnitte immunhistochemisch gegen „Proliferating Cell Nuclear Antigen“ (PCNA) gefärbt. In anderen Studien hat sich PCNA als ein zuverlässiger Marker der Proliferationsaktivität erwiesen. Es kann durch direkte Immunhistochemie mit einem monoklonalen Maus-anti-PCNA-Antikörper (1:200; Amersham, Freiburg, Deutschland) markiert werden. Dieser ist mit 3,3-Diaminobenzidin gekoppelt und kann somit nach entsprechender Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer unter einem Lichtmikroskop sichtbar gemacht werden.

Zur Darstellung von Perizyten wurden Schnitte immunhistochemisch gegen Desmin gefärbt. Dafür wurde als Primärantikörper ein monoklonaler Maus-anti-Desmin-Antikörper (1:50; Dako, Hamburg, Deutschland) verwendet, als Sekundärantikörper diente ein Ziegenanti-Maus-Antikörper (1:200; Amersham, Freiburg, Deutschland). Als Chromogen zum Nachweis der Antigen-Antikörperreaktion diente 3,3-Diaminobenzidin. Nach Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer konnten die Schnitte lichtmikroskopisch beurteilt werden.

5.5. Western Blot

Als Western Blot bezeichnet man eine Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran. Es handelt sich um eine quantitative Methode zur Ermittlung der Proteinexpression in einer Gewebeprobe. Die Bezeichnung „Western-Blotting“ wurde erstmals von Burnette et al. [1981] eingeführt.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Analyse der Proteinexpression von PCNA, VEGF, Caspase-3 und aktivierter Caspase-3 in eutopem oder transplantiertem Endometrium. Hierzu wurde das isolierte Gewebe in Flüssigstickstoff konserviert. Für die Proteinextraktion wurden die Proben in einem Lysis-Puffer homogenisiert (10mM Tris pH 7,5; 10mM NaCl; 0,1mM Ethylendiamintetraessigsäure, 0,5% Triton-X 100; 0,02% NaN₃; 0,2mM Phenylmethylsulfonylfourid und Protease-Inhibitor Cocktail (1:100 v/v; Sigma)), 30min auf Eis inkubiert und anschließend 30min bei 16000g (4°C) zentrifugiert. Der Überstand (Gesamtzelllysat) wurde dann abpipettiert und zur Proteinbestimmung eingesetzt.

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte nach Lowry et al. [1951]. Diese Methode beruht auf der Farbreaktion mit Folin-Ciocalteu's Phenol-Reagenz und Kupfersulfat. Der entstandene Farbkomplex wurde photometrisch gemessen und die Proteinkonzentration mit Hilfe einer BSA-Standard Kurve ermittelt. Danach wurden pro Bande je 60µg des Proteins auf ein Polyacrylamid-Gel aufgebracht und im elektrischen Feld nach Molekulargewicht aufgetrennt. Durch das gerichtete elektrische Feld wanderten die Proteine aus dem Gel auf eine Polyvinylidendifluorid Membran (BioRad, München, Deutschland). Das Ziel dabei war es, die an die Membran gebundenen Proteine mit Hilfe von spezifischen Antikörpern zu quantifizieren. Die hier eingesetzten Primärantikörper waren ein monoklonaler Maus-anti-PCNA-Antikörper (1:500; Dako, Hamburg, Deutschland), ein polyklonaler Kaninchen-anti-aktivierter-Caspase-3-Antikörper (1:800; Cell Signaling, Frankfurt, Deutschland) und ein monoklonaler Maus-anti-VEGF-Antikörper (1:100; Dako, Hamburg, Deutschland). Dann wurde ein HRP (horseradish peroxidase)-konjugierter Sekundär-Antikörper (1:5000; Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) aufgebracht. Zur Detektion wurde ein Chemilumineszenz-Substrat eingesetzt, das enzymatisch zu einem Licht emittierenden Produkt umgesetzt wurde. Die Aufzeichnung erfolgte durch Autoradiographie auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm, ECL; Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland). Zur Kontrolle der Proteinbeladung und des Proteintransfers wurde der monoklonale Maus-anti-β-Aktin-Antikörper (1:5000; Sigma, Deutschland) als interner Standard eingesetzt. In allen Western-Blot-Analysen wurde die densitometrisch ermittelte optische Dichte \times Fläche (mm²) auf die gleiche β-Aktin-Konzentration korrekturgerechnet. Die Auswertung der Röntgenfilme erfolgte mit einem Gel-Dokumentationssystem (Gel-Doc; BioRad, München, Deutschland) und entsprechendem Quantifizierungsprogramm (Quantity one, BioRad, München, Deutschland).

5.6. Aorten-Ring-Assay

Zur *in vitro* Analyse der anti-angiogenen Potenz von Rapamycin wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich zu den *in vivo* Versuchen ein Aorten-Ring-Assay durchgeführt. Hierzu erfolgte die Isolierung der thorakalen Aorta aus drei Spenderhamstern. Die Aorta wurde in eine Petrischale mit DMEM transferiert, dort von Bindegewebsresten gesäubert und zur Entfernung von Blutkoageln mit Medium durchgespült. Anschließend wurden aus der Aorta jeweils acht Aortenringe mit einer Höhe von ca. 1mm geschnitten. Diese wurden in 200µl Matrigel (Basement Matrix™, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) eingebettet, das bei 37°C und 5% CO₂ für 30min polymerisierte. Anschließend wurden die Ringe mit 800µl DMEM bedeckt, das entweder mit 30µM Rapamycin (gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO)) oder DMSO (1:1000; Kontrolle) angereichert war. Die Ringe lagerten konstant bei 37°C und 5% CO₂ für 7 Tage im Brutschrank. Der Austausch des Mediums erfolgte jeden zweiten Tag. Die Aorten-

ringe wurden jeden Tag unter einem Durchlicht-Phasenkontrast-Mikroskop kontrolliert. Zur quantitativen Auswertung des Aorten-Ring-Assays, wurden die Ringe am 7. Tag mit Hilfe eines Videosystems (TEC-470, SI GmbH, Gilching, Deutschland) auf Videoband aufgenommen und anschließend mit Hilfe des computer-assistierten Bildverarbeitungssystems CapImage analysiert. Die Auswertung umfasste die Bestimmung der Gesamtfläche aller aus dem Aortenring gewachsenen Gefäßsprossen (in mm²) und die maximale Länge der Sprossen (µm).

5.7. Experimentelles Protokoll

5.7.1. Versuchsablauf

Um zu gewährleisten, dass sich für die Versuche alle Tiere im gleichen Zyklusstadium befanden, wurden die Tiere zunächst wie in Abschnitt 5.2.3. beschrieben hormonell synchronisiert. Nach Präparation der Rückenhautkammer konnten sich alle Versuchstiere für 48 Stunden erholen. Im Anschluss erfolgte die Transplantation des Endometriums. Das Aussehen der Rückenhautkammer und der darin befindlichen Transplantate wurde makroskopisch täglich qualitativ beurteilt und dokumentiert.

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie erfolgte am Tag der Transplantation (Tag 0) sowie am 2., 4., 7., 10. und 14. Tag. Alle Tiere erhielten jeweils direkt vor der Mikroskopie eine retrobulbäre Injektion der Fluoreszenzfarbstoffe FITC Dextran (5%) und Rhodamin-6G (0,1%) (siehe 5.3.). Folgende Parameter konnten somit untersucht werden:

- 1.) *Transplantatgröße (siehe 5.3.1.1.)*
- 2.) *Fläche der revaskularisierten Gewebeareale (siehe 5.3.1.1.)*
- 3.) *Funktionelle Kapillardichte (siehe 5.3.1.2.)*
- 4.) *Kapillardurchmesser neu gebildeter Gefäße (siehe 5.3.1.3.)*
- 5.) *Blutzellgeschwindigkeit (siehe 5.3.1.4.)*
- 6.) *Mikrovaskulärer Blutfluss (siehe 5.3.1.5.)*
- 7.) *Fließverhalten der Leukozyten (5.3.)*

Am 14. Tag der jeweiligen Versuchsreihen wurden die Tiere mit einer Überdosis Pentobarbital euthanasiert. Von den Rückenhautkammer-Präparationen wurden anschließend histologische Schnitte angefertigt.

5.7.2. Versuchsgruppen

5.7.2.1. Bedeutung von Hormonstatus und Endometrium-Fragmentgröße

Das Ziel dieser Versuchsreihe war es, die Angiogenese in Endometrioseherden in Abhängigkeit des Hormonstatus der Tiere und der Größe der transplantierten Endometrium-Fragmente zu untersuchen.

Hierzu wurden die folgenden Versuchsgruppen analysiert:

- 1) Gruppe „unbehandelt“: In 5 nicht synchronisierte Tiere wurden 17 Endometrium-Fragmente transplantiert
- 2) Gruppe „hormonell synchronisiert“: In 8 hormonell synchronisierte Tiere wurden 19 Endometrium-Fragmente transplantiert
- 3) Gruppe „bilateral ovariectomiert“: In 6 bilateral ovariectomierte Tiere wurden 19 Endometrium-Fragmente transplantiert

Entsprechend ihrer durchschnittlichen Größe konnten die Transplantate innerhalb der 3 Versuchsgruppen wiederum in 2 Untergruppen unterschieden werden:

- 1) Transplantatgröße $\sim 0,1\text{mm}^2$
- 2) Transplantatgröße $\sim 0,5\text{mm}^2$

5.7.2.2. Bedeutung der pro-angiogenen Faktoren VEGF, FGF und PDGF

Das Ziel dieser Versuchsreihe war es, den Einfluss der pro-angiogenen Wachstumsfaktoren VEGF, FGF und PDGF auf die Angiogenese in Endometrioseherden zu untersuchen. Hierzu wurden die Tyrosinkinase-Inhibitoren SU5416 und SU6668 eingesetzt. SU5416 hemmt selektiv die Wirkung von VEGF, während SU6668 ein multipotenter Inhibitor von VEGF, FGF und PDGF ist [Vajkoczy et al., 1999; Laird et al., 2000; Bergers et al., 2003].

Folgende Versuchsgruppen wurden analysiert:

- 1) Gruppe „SU5416“: In 8 hormonell synchronisierten Tieren, die täglich mit SU5416 (25mg/kg KG i.p. gelöst in 150µl DMSO) behandelt wurden, erfolgte die autologe Transplantation von 25 Endometrium-Fragmenten
- 2) Gruppe „SU6668“: In 4 hormonell synchronisierten Tieren, die täglich mit SU6668 (75mg/kg KG i.p. gelöst in 150µl DMSO) behandelt wurden, erfolgte die autologe Transplantation von 15 Endometrium-Fragmenten
- 3) Gruppe „Kontrolle“: In 5 hormonell synchronisierten Tieren, die täglich mit DMSO (150µl DMSO) behandelt wurden, erfolgte die autologe Transplantation von 18 Endometrium-Fragmenten

5.7.2.3. Einfluss des selektiven Cyclooxygenase-2-Inhibitors NS398

Das Ziel dieser Versuchsreihe war es, die Wirkung des selektiven Cyclooxygenase-2-Inhibitors NS398 auf die Angiogenese, das Zellwachstum und die Apoptose in Endometrioseherden zu untersuchen.

Hierzu wurden folgende Versuchsgruppen analysiert:

- 1) Gruppe „NS398“: In 7 hormonell synchronisierten Tieren, die täglich mit dem selektiven Cyclooxygenase-2-Inhibitor NS398 (5mg/kg KG i.p. gelöst in 150µl DMSO) behandelt wurden, erfolgte die autologe Transplantation von 28 Endometrium-Fragmenten
- 2) Gruppe „Kontrolle“: In 6 hormonell synchronisierten Tieren, die täglich mit DMSO (150µl DMSO) behandelt wurden, erfolgte die autologe Transplantation von 24 Endometrium-Fragmenten

5.7.2.4. Einfluss des Immunsuppressivums Rapamycin

Das Ziel dieser Versuchsreihe war es, die Wirkung des Immunsuppressivums Rapamycin auf die Angiogenese, das Zellwachstum und die Apoptose in Endometrioseherden zu untersuchen.

Hierzu wurden folgende Versuchsgruppen analysiert:

- 1) Gruppe „Rapamycin“: In 7 hormonell synchronisierten Tieren, die täglich mit dem Immunsuppressivum Rapamycin (1,5mg/kg i.p. gelöst in 150µl DMSO) behandelt wurden, erfolgte die autologe Transplantation von 28 Endometrium-Fragmenten
- 2) Gruppe „Kontrolle“: In 5 hormonell synchronisierten Tieren, die täglich mit DMSO (150µl DMSO) behandelt wurden, erfolgte die autologe Transplantation von 20 Endometrium-Fragmenten

Neben den Rückenhautkammer-Versuchen wurde in dieser Versuchsreihe zusätzlich ein Aorten-Ring-Assay durchgeführt (siehe 5.6.).

5.8. Statistik

Sämtliche Daten werden als Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwertes ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) angegeben. Dabei rekrutieren sich die Mittelwerte der einzelnen mikrozirkulatorischen Parameter an den jeweiligen Untersuchungstagen aus der Anzahl der transplantierten Endometrium-Fragmente.

Bei Normalverteilung der Werte erfolgte der Vergleich zwischen zwei Gruppen an den einzelnen Untersuchungstagen mittels Student's t-Test für den unverbundenen Paarvergleich. Im Fall von mehreren Gruppen, erfolgte der Vergleich mittels „one way analysis of variance“ (ANOVA) gefolgt vom Bonferroni-t-Test. Signifikante Unterschiede von Werten innerhalb einer Gruppe wurden mit Hilfe des gepaarten Student's t-Test und Korrektur des alpha-Fehlers nach Bonferroni für wiederholte Messungen geprüft.

Falls eine Normalverteilung der Werte ausgeschlossen werden konnte, erfolgte der Gruppenvergleich mit der Kruskal Wallis Varianzanalyse und der paarweise Vergleich mit dem Mann-Whitney-U-Test. Entsprechend wurden signifikante Unterschiede innerhalb einer Gruppe durch die Friedman Rangvarianz Analyse, gefolgt vom Wilcoxon Paar Test mit Korrektur des alpha-Fehlers für statistische Berechnungen bei Messwiederholungen bestimmt.

Sämtliche statistische Tests erfolgten unter Verwendung des Software Pakets SigmaStat (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA). Bei Prüfung wurden Unterschiede mit $p < 0,05$ als signifikant angesehen.

6. Ergebnisse

6.1. Bedeutung von Hormonstatus und Endometrium-Fragmentgröße

6.1.1. Entwicklung der Transplantate

In dieser Versuchsreihe wurden zunächst große und kleine Endometrium-Fragmente, welche in die Rückenhautkammer von unbehandelten, hormonell synchronisierten oder ovariectomierten Hamstern transplantiert wurden, untersucht. Um eine Beeinflussung der Angiogenese aufgrund der Größe individueller Transplantate auszuschließen, wiesen die Transplantate der jeweiligen Gruppen zu Beginn der Untersuchungen eine vergleichbare Größe auf. Die großen Transplantate hatten eine initiale Größe von $0,55 \pm 0,04 \text{ mm}^2$ (unbehandelte Tiere), $0,55 \pm 0,06 \text{ mm}^2$ (synchronisierte Tiere) und $0,50 \pm 0,04 \text{ mm}^2$ (ovarektomierte Tiere). Im Gegensatz dazu zeichneten sich die kleinen Transplantate durch eine initiale Größe von $0,11 \pm 0,01 \text{ mm}^2$ (unbehandelte Tiere), $0,13 \pm 0,01 \text{ mm}^2$ (synchronisierte Tiere) und $0,11 \pm 0,01 \text{ mm}^2$ (ovarektomierte Tiere) aus.

Die transplantierten Endometrium-Fragmente wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen analysiert. Dabei konnte für das Größenwachstum der Transplantate zwischen den unbehandelten, synchronisierten und ovariectomierten Tieren kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die großen Fragmente wiesen innerhalb des Beobachtungszeitraums eine Größenzunahme um ~60-70% auf, bei den kleinen Endometrium-Fragmenten konnte sogar eine Größenzunahme von ~80-90% beobachtet werden.

6.1.2. Mikrovaskuläres Netzwerk

In der Gruppe der unbehandelten und hormonell synchronisierten Tiere erfolgte die Revascularisierung der großen und kleinen Endometrium-Fragmente bereits ab dem 2. Tag nach Transplantation in die Rückenhautkammer (*Abbildung 6 und 7*). Die beginnende Angiogenese war zunächst durch die Vasodilatation einzelner Kapillaren des Rückenhautmuskels im Bereich um die Transplantate gekennzeichnet. Des Weiteren bildeten sich ausgehend von diesen Kapillaren einzelne Gefäßsprossen aus, die in die Transplantate einwuchsen und dort in den Folgetagen zur Ausbildung neuer mikrovaskulärer Netzwerke führten. Durch ihre glomerulum-artige Angioarchitektur konnten sie sehr gut von den parallel angeordneten Kapillaren der quergestreiften Rückenhautmuskulatur unterschieden werden (*Abbildung 6*). Die Gefäßnetzwerke erreichten am 14. Tag eine Dichte von $\sim 300\text{-}400 \text{ cm/cm}^2$ (*Tabelle 2*).

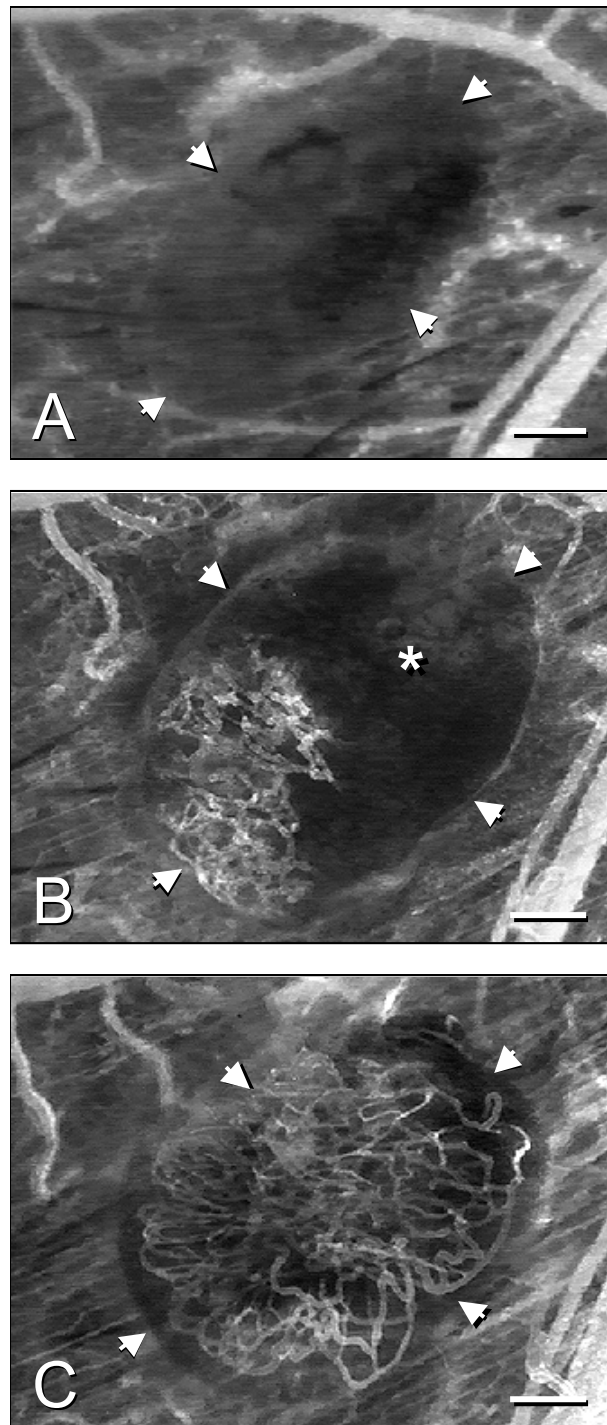


Abbildung 6: Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines großen Endometrium-Fragments am Tag 0 (A), Tag 2 (B) und Tag 10 (C) nach Transplantation in die Rückenhautkammer des Syrischen Goldhamsters. Die Pfeile markieren jeweils die Grenzen des Endometriums. (A) Am Tag 0 ist das Transplantat noch avaskulär. (B) Am 2. Tag ist bereits in einem Bereich des Transplantats ein neugebildetes Gefäßnetzwerk sichtbar, während ein großer Teil (Sternchen) noch nicht von neuen Blutgefäßen durchwachsen ist. (C) Am 10. Tag weist das Transplantat schließlich ein vollständiges glomerulum-artiges Gefäßnetzwerk auf (Kontrastverstärkung mit FITC-Dextran in Blaulicht-Epi-Illumination; A,B,C : – 200µm).

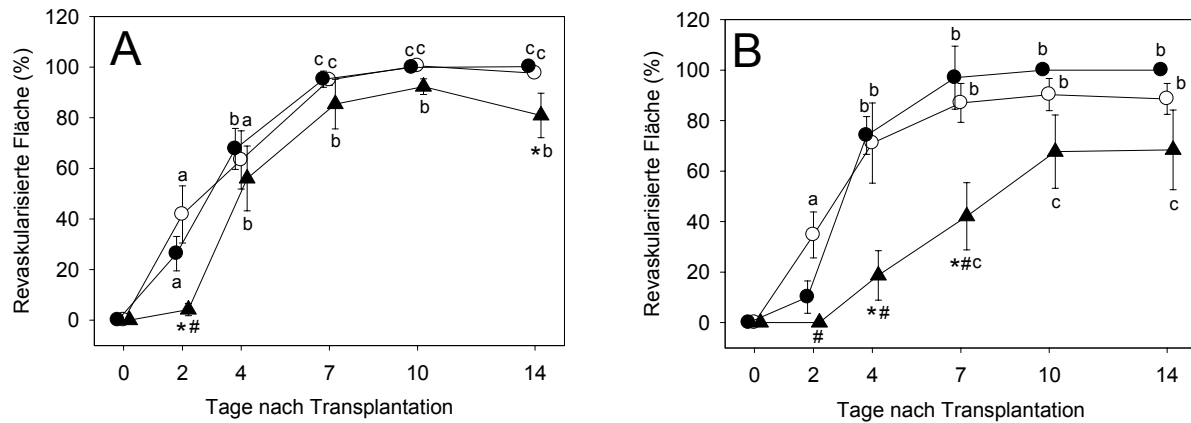


Abbildung 7: Revaskularisierte Fläche (%) in großen (A) und kleinen (B) Endometrium-Fragmenten nach Transplantation in die Rückenhautkammer von unbehandelten (○), synchronisierten (●) und ovariectomierten Syrischen Goldhamstern (▲). Mittelwerte \pm SEM; ^{*} $P < 0,05$ vs. synchronisierte Tiere; [#] $P < 0,05$ vs. unbehandelte Tiere; ^a $P < 0,05$ vs. Tag 0; ^b $P < 0,05$ vs. Tag 0 und 2; ^c $P < 0,05$ vs. Tag 0, 2 und 4.

Gruppe	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Tag 14
Große Tx (~0,5mm²)					
Unbehandelt	231 \pm 35	330 \pm 44 ^a	416 \pm 22 ^a	363 \pm 24 ^a	360 \pm 22 ^a
Synchronisiert	282 \pm 15	370 \pm 24 ^a	374 \pm 18 ^a	411 \pm 17 ^a	410 \pm 34 ^a
Ovariectomiert	115 \pm 40 [*]	270 \pm 44 ^a	405 \pm 37 ^b	388 \pm 37 ^b	343 \pm 24 ^b
Kleine Tx (~0,1mm²)					
Unbehandelt	306 \pm 29	375 \pm 26	362 \pm 34	284 \pm 36	383 \pm 34
Synchronisiert	198 \pm 40	346 \pm 34 ^a	333 \pm 36 ^a	346 \pm 19 ^a	380 \pm 21 ^a
Ovariectomiert	0 \pm 0 ^{*#}	301 \pm 82 ^a	405 \pm 47 ^a	376 \pm 46 ^a	361 \pm 44 ^a

Tabelle 2: Funktionelle Kapillardichte (cm/cm²) neugebildeter Gefäßnetzwerke in großen und kleinen Endometrium-Fragmenten, die in die Rückenhautkammer von unbehandelten, synchronisierten und ovariectomierten Syrischen Goldhamstern transplantiert wurden. Mittelwerte \pm SEM; ^{*} $P < 0,05$ vs. synchronisierte Tiere; [#] $P < 0,05$ vs. unbehandelte Tiere; ^a $P < 0,05$ vs. Tag 2; ^b $P < 0,05$ vs. Tag 2 und 4.

Im Gegensatz dazu erfolgte die Revaskularisierung von Endometrium-Fragmenten, die in die Rückenhautkammer von ovariectomierten Tieren transplantiert wurden, deutlich verzögert. So wiesen die großen Endometrium-Fragmente der ovariectomierten Tiere im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen am 2. Tag eine signifikant reduzierte revaskularisierte Fläche auf (Abbildung 7). Dieser Unterschied war im Falle der kleinen Transplantate noch ausgeprägter, die in den ovariectomierten Tieren zu diesem Zeitpunkt noch keine neuen Gefäße zeigten (Abbildung 7). Erst in den Folgetagen kam es hier zu einer verzögerten Angiogenese mit neugebildeten Blutgefäßen, die initial jedoch noch keine Perfusion aufwiesen (Abbildung 8). Des Weiteren waren die Gefäßnetzwerke der großen und kleinen Endometrium-Fragmente in der ovariectomierten Gruppe während der ersten Beobachtungstage durch eine signifikant erniedrigte funktionelle Kapillardichte gekennzeichnet (Tabelle 2).

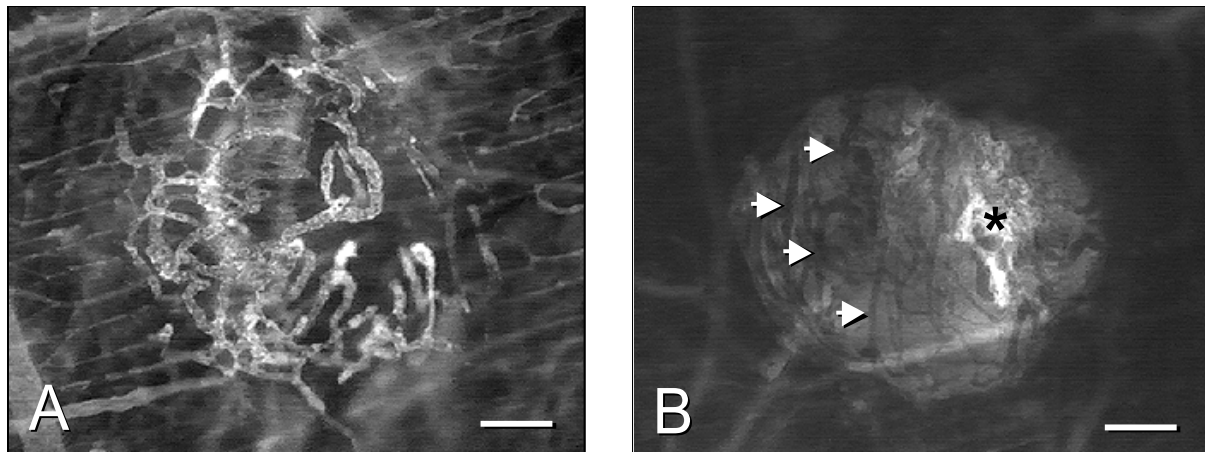


Abbildung 8: Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von kleinen Endometrium-Fragmenten am Tag 4 nach Transplantation in die Rückenhautkammer eines unbehandelten (A) und ovariectomierten (B) Syrischen Goldhamsters. Die Aufnahme des ovariectomierten Tieres zeigt eine verzögerte Angiogenese mit einer deutlich reduzierten revaskularisierten Fläche (B, Sternchen) am 4. Tag. Bereits vorhandene, aber noch nicht perfundierte Kapillaren erscheinen in der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie zu diesem Zeitpunkt als schwarze Gefäßstrukturen (B, Pfeile). (Kontrastverstärkung mit FITC-Dextran in Blaulicht-Epi-Illumination; A,B: – 125µm).

6.1.3. Mikrohämodynamik

Im Rahmen der Angiogenese findet sich im Zeitverlauf normalerweise eine Reduktion der Durchmesser neugebildeter Gefäße durch Stabilisierung der Gefäßwandstruktur. Dieser Prozess konnte in allen 3 Versuchsgruppen beobachtet werden. So reduzierten sich die Kapillardurchmesser während des Beobachtungszeitraums kontinuierlich von ~12-17µm am Tag 2 auf ~10-11µm am Tag 14 (Tabelle 3).

Transplantate	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Tag 14
Große Tx (~0,5mm²)					
Unbehandelt	16,9 ± 1,3	14,5 ± 1,4	10,9 ± 0,3 ^b	10,6 ± 0,5 ^b	10,9 ± 0,6 ^b
Synchronisiert	16,4 ± 1,4	14,2 ± 0,9	12,3 ± 0,7 ^b	11,7 ± 0,2 ^b	10,9 ± 0,3 ^d
Ovariectomiert	14,6 ± 0,2	14,1 ± 0,9	10,2 ± 0,5 ^{*b}	10,1 ± 0,4 ^{*b}	10,3 ± 0,3 ^b
Kleine Tx (~0,1mm²)					
Unbehandelt	12,0 ± 1,0 [*]	11,7 ± 0,7	9,2 ± 0,5 ^{*b}	9,0 ± 0,6 ^b	9,7 ± 0,8
Synchronisiert	17,1 ± 1,9	12,5 ± 0,6 ^a	12,2 ± 0,6 ^a	10,3 ± 0,3 ^c	10,0 ± 0,2 ^c
Ovariectomiert	--	11,2 ± 0,5	10,6 ± 0,6	10,7 ± 0,5	9,9 ± 0,6

Tabelle 3: Gefäßdurchmesser (µm) von neugebildeten Kapillaren in großen und kleinen Endometrium-Fragmenten, die in die Rückenhautkammer von unbehandelten, synchronisierten und ovariectomierten Syrischen Goldhamstern transplantiert wurden. Mittelwerte ± SEM; ^{*}P<0,05 vs. synchronisierte Tiere; ^aP<0,05 vs. Tag 2; ^bP<0,05 vs. Tag 2 und 4; ^cP<0,05 vs. Tag 2, 4 und 7; ^dP<0,05 vs. Tag 2, 4, 7 und 10.

Die Blutzellgeschwindigkeit, die in den neugebildeten Gefäßen der Transplantate gemessen wurde, nahm bis zum 14. Tag in den unbehandelten und synchronisierten Tieren auf ~400µm/s in den großen Fragmenten bzw. ~260µm/s in den kleinen Fragmenten zu (Abbildung 9). Auch hier zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Gruppe der ovariectomierten Hamster. So war hier die Blutzellgeschwindigkeit im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen sowohl in den großen als auch in den kleinen Endometrium-Fragmenten signifikant

reduziert. In den großen Transplantaten konnte eine Maximalgeschwindigkeit von nur $\sim 140 \mu\text{m/s}$ am 14. Tag nach Transplantation beobachtet werden (Abbildung 9).

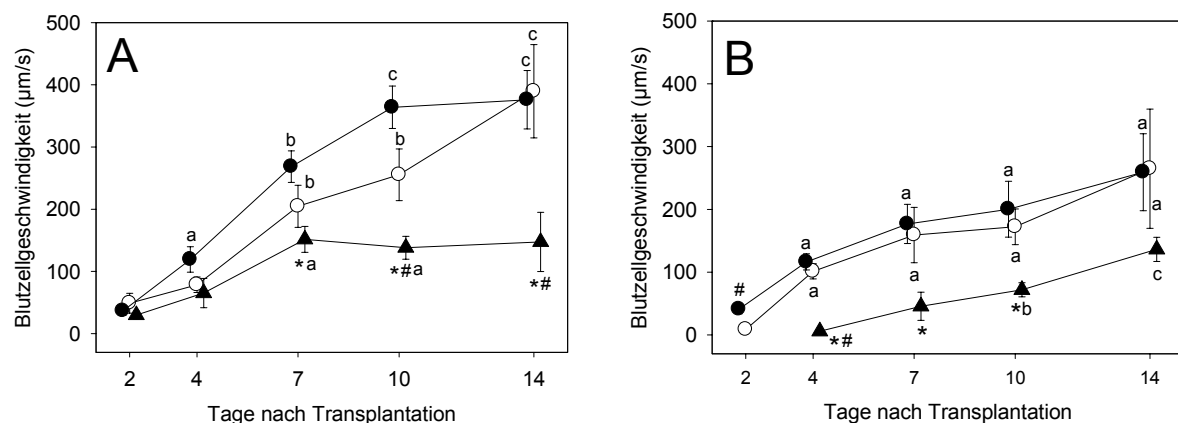


Abbildung 9: Blutzellgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$) in großen (A) und kleinen (B) Endometrium-Fragmenten nach Transplantation in die Rückenhautkammer von unbehandelten (○), synchronisierten (●) und ovariectomierten (▲) Syrischen Goldhamstern. Mittelwerte \pm SEM; * $P < 0,05$ vs. synchronisierte Tiere; # $P < 0,05$ vs. unbehandelte Tiere; ^a $P < 0,05$ vs. Tag 2; ^b $P < 0,05$ vs. Tag 2 und 4; ^c $P < 0,05$ vs. Tag 2, 4 und 7.

Entsprechend unterschieden sich die einzelnen Gruppen auch bezüglich des mikrovasculären Blutflusses. So wiesen die großen Transplantate in den unbehandelten und synchronisierten Tieren am 14. Tag einen mikrovasculären Blutfluss von $\sim 25 \text{pl/s}$ auf, während in den großen Transplantaten der ovariectomierten Tiere zu diesem Zeitpunkt ein signifikant erniedrigter Blutfluss von nur $\sim 8 \text{pl/s}$ messbar war (Abbildung 10). Zusätzlich war der mikrovasculäre Blutfluss auch in den kleinen Transplantaten der ovariectomierten Tiere im Vergleich zur unbehandelten und synchronisierten Gruppe deutlich reduziert (Abbildung 10).

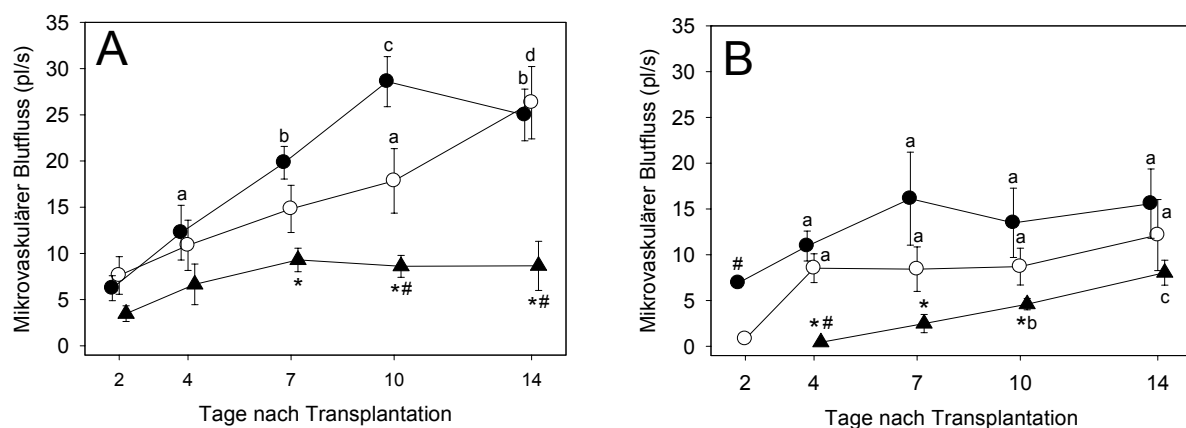


Abbildung 10: Mikrovasculärer Blutfluss (pl/s) in großen (A) und kleinen (B) Endometrium-Fragmenten nach Transplantation in die Rückenhautkammer von unbehandelten (○), synchronisierten (●) und ovariectomierten (▲) Syrischen Goldhamstern. Mittelwerte \pm SEM; * $P < 0,05$ vs. synchronisierte Tiere; # $P < 0,05$ vs. unbehandelte Tiere; ^a $P < 0,05$ vs. Tag 2; ^b $P < 0,05$ vs. Tag 2 und 4; ^c $P < 0,05$ vs. Tag 2, 4 und 7; ^d $P < 0,05$ vs. Tag 2, 4, 7 und 10.

6.1.4. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Durch die retrobulbäre Gabe des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin-6G war es möglich, das Fließverhalten der Leukozyten in den neugebildeten Gefäßen der Endometrium-Transplantate zu untersuchen. Dabei konnte gezeigt werden, dass nahezu alle Leukozyten (>95%) die neugebildeten Gefäßnetzwerke ohne eine nachweisbare Interaktion mit dem Gefäßendothel passierten. Dies zeigt, dass die Transplantate in der Rückenhautkammer keine Entzündungs- bzw. Abstoßungsreaktion induzierten (*Abbildung 11*).

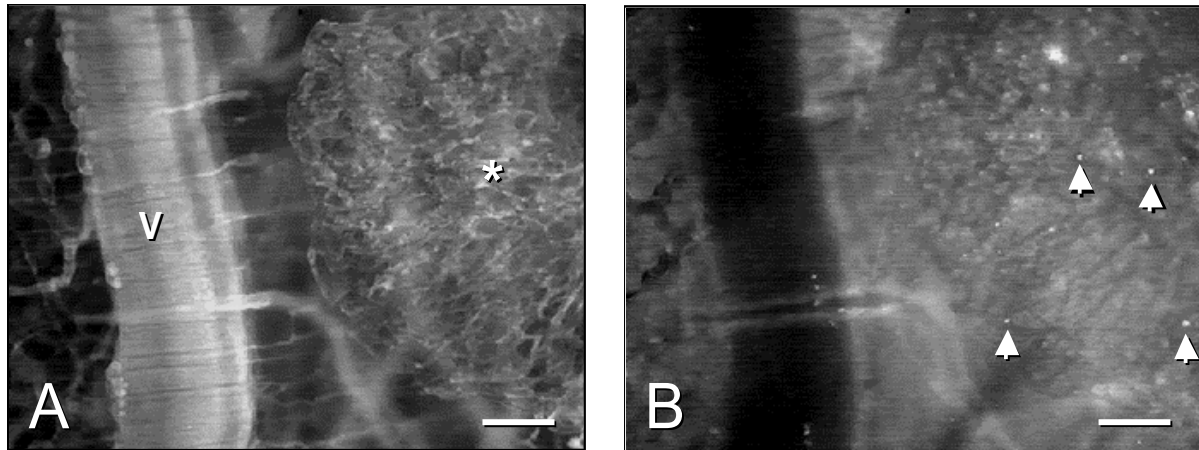


Abbildung 11: A: Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Endometrium-Fragments (Sternchen) am Tag 10 nach Transplantation in die Rückenhautkammer eines unbehandelten Syrischen Goldhamsters. Das Transplantat ist direkt neben einer großen Sammelvenole (v) lokalisiert und weist zu diesem Untersuchungszeitpunkt bereits ein dichtes mikrovaskuläres Netzwerk auf. B: Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Rhodamin-6G können die Leukozyten innerhalb des Gefäßnetzwerkes dargestellt werden. Dabei zeigt sich, dass nur wenige Leukozyten am Gefäßendothel adhären (Pfeile), während die meisten Leukozyten das Gefäßnetzwerk frei passieren (A: Kontrastverstärkung mit FITC-Dextran in Blaulicht-Epi-Illumination; B: Rhodamin-6G-Färbung der Leukozyten in Grünlicht-Epi-Illumination; A,B: – 125µm).

6.1.5. Histologie und Immunhistochemie

Die histologische Analyse der Rückenhautkammerpräparationen am 14. Tag zeigte, dass sich aus den transplantierten Endometrium-Fragmenten typische Endometrioseherde entwickelt hatten. Diese waren histomorphologisch charakterisiert durch zystisch erweiterte Drüsenformationen, die von einem dicht vaskularisierten Stroma umgeben waren (*Abbildung 12*). Die Drüsenformationen konnten auch in der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden, da sich der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin-6G im Drüsenepithel anreicherte (*Abbildung 12*).

Durch die immunhistochemische Darstellung von PCNA konnte in den Endometrioseherden ein vermehrtes Zellwachstum im Drüsenepithel, im Stroma sowie im Endothel der neuen Blutgefäße nachgewiesen werden (*Abbildung 12*). Dies bestätigte die Ergebnisse der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie, bei der eine Größenzunahme der Transplantate gemessen wurde.

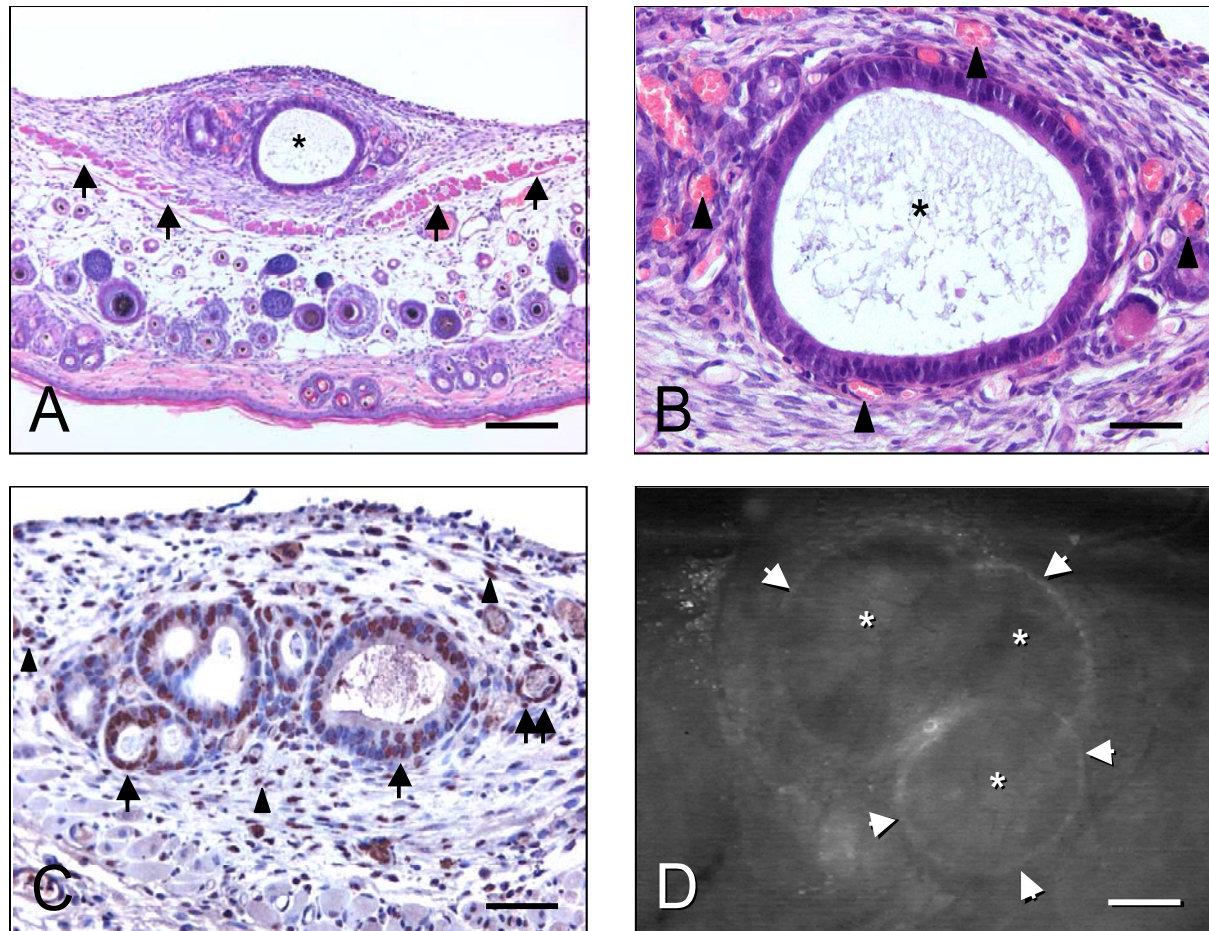


Abbildung 12: A: Histologisches Schnittpräparat eines großen Endometrium-Fragments am Tag 14 nach Transplantation auf die quergestreifte Muskulatur (Pfeile) in der Rückenhautkammer eines unbehandelten Syrischen Goldhamsters. B: Die höhere Vergrößerung zeigt die typischen histomorphologischen Merkmale eines Endometrioseherdes mit zystisch erweiterten Drüsen (Sternchen), die von einem stark vaskularisierten Stroma mit vielen neugebildeten Blutgefäßen (Pfeilspitzen) umgeben sind. C: Durch den immunhistochemischen Nachweis des Proliferationsmarkers PCNA können proliferierende Zellen im Drüsenepithel (Pfeile), im Stroma (Pfeilspitzen) und im Endothel der neugebildeten Blutgefäße (Doppelpfeile) nachgewiesen werden. D: Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Endometrium-Fragments am Tag 14 nach Transplantation in die Rückenhautkammer eines ovariectomierten Syrischen Goldhamsters. In Grünlicht-Epi-Illumination können die Grenzen von drei Endometriumzysten (Sternchen) dargestellt werden, da der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin-6G im Drüsenepithel (Pfeile) akkumuliert (A,B: Hämatoxylin-Eosin-Färbung; C: Immunhistochemischer Nachweis von PCNA; D: Intravital Fluoreszenzmikroskopie in Grünlicht-Epi-Illumination; A: – 230µm; B: – 70µm; C: – 120µm; D: – 200µm).

6.2. Bedeutung der pro-angiogenen Faktoren VEGF, FGF und PDGF

6.2.1. Entwicklung der Transplantate

Die transplantierten Endometrium-Fragmente dieser Versuchsreihe hatten eine initiale Größe von $0,56 \pm 0,05 \text{ mm}^2$, $0,55 \pm 0,10 \text{ mm}^2$ und $0,48 \pm 0,01 \text{ mm}^2$ in den Tieren, die mit SU5416 (Inhibition von VEGF), SU6668 (Inhibition von VEGF, FGF und PDGF) und DMSO (Kontrolle) behandelt wurden. Entsprechend lagen zu Beginn der Versuche keine signifikanten Größenunterschiede zwischen den Versuchsgruppen vor, die zu einer möglichen Beeinträchtigung der angiogenen Reaktion des Empfängergewebes auf die Transplantate hätten führen können.

Während des Beobachtungszeitraums von 14 Tagen nahm die Größe der Transplantate in der DMSO und SU5416 Gruppe auf etwa 80% der Ausgangsgröße ab (*Abbildung 13*). Diese Größenabnahme war in der SU6668 Gruppe wesentlich stärker ausgeprägt, so dass hier die Transplantate am 14. Tag nur noch etwa 55% der Ausgangsgröße aufwiesen (*Abbildung 13*).

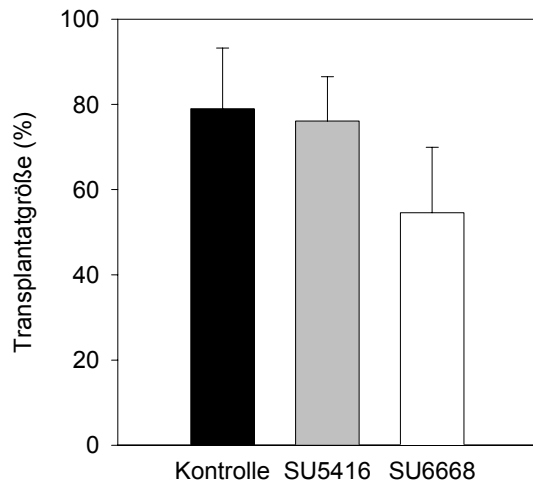


Abbildung 13: Transplantatgröße (in % zur Ausgangsgröße) der Endometrium-Fragmente am Tag 14 nach Transplantation in die Rückenhautkammer von Syrischen Goldhamstern, denen täglich DMSO (Kontrolle), SU5416 oder SU6668 appliziert wurde. Mittelwerte \pm SEM.

6.2.2. Mikrovaskuläres Netzwerk

In allen drei Gruppen zeigten sich in den Transplantaten bereits am 2. Tag erste Zeichen der Angiogenese. Hierzu zählten Gefäßsprossen und neugebildete, sinusoidal erweiterte Blutgefäße. Im weiteren Verlauf entwickelten sich daraus glomerulum-artige Gefäßnetzwerke, die in der Kontrollgruppe und der Gruppe der SU5416-behandelten Tiere bereits am 4. Tag nahezu vollständig ausgebildet waren (*Abbildung 14*). Dagegen wiesen die Transplantate in den SU6668-behandelten Tieren eine signifikant reduzierte revaskularisierte Fläche von ~55-70% auf, die während des 14-tägigen Beobachtungszeitraums nicht mehr weiter zunahm (*Abbildung 14*).

Die neugebildeten Gefäßnetzwerke der Kontrollgruppe hatten eine funktionelle Kapillardichte von $\sim 300 \text{ cm/cm}^2$ (*Abbildung 14*). Während die Gefäßnetzwerke in den SU5416-behandelten Tieren am 4. Tag eine vergleichbare Dichte aufwiesen, kam es an den späteren Untersuchungstagen zu einer signifikanten Reduktion der Gefäßdichte auf $\sim 220 \text{ cm/cm}^2$. Die Abnahme der funktionellen Kapillardichte war in den SU6668-behandelten Tieren noch stärker ausgeprägt, deren Gefäßnetzwerke am 14. Tag nur noch eine Dichte von $\sim 180 \text{ cm/cm}^2$ erreichten (*Abbildung 14*).

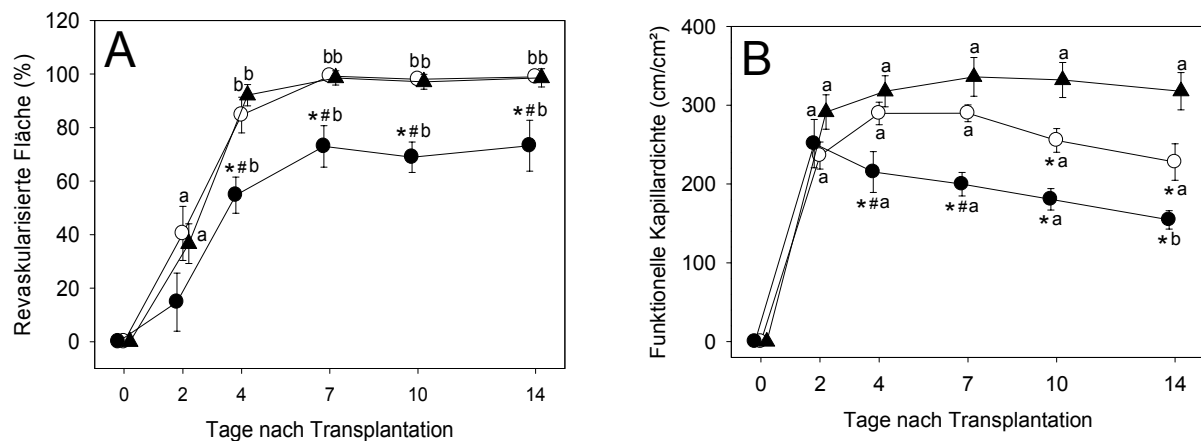


Abbildung 14: (A) Revaskularisierte Fläche (%) und (B) funktionelle Kapillardichte (cm/cm²) von Endometrium-Fragmenten nach Transplantation in die Rückenhautkammer Syrischer Goldhamster, denen täglich DMSO (Kontrolle, ▲), SU5416 (○) oder SU6668 (●) appliziert wurde. Mittelwerte ± SEM. *P<0,05 vs. Kontrolle; #P<0,05 vs. SU5416-behandelte Tiere; ^aP<0,05 vs. Tag 0; ^bP<0,05 vs. Tag 0 und 2.

6.2.3. Mikrohämodynamik

Die Kapillardurchmesser neugebildeter Gefäße reduzierten sich in der Kontrollgruppe und der SU5416-Gruppe von ~16-17µm am 2. Tag auf ~11µm am 14. Tag (Tabelle 4). Dagegen wiesen die Gefäße in der SU6668-Gruppe während des gesamten Beobachtungszeitraums einen konstanten Durchmesser von ~16-17µm auf und waren interessanterweise durch sinusoidale Gefäßwandaussackungen gekennzeichnet (Tabelle 4, Abbildung 15).

Die Blutzellgeschwindigkeit erreichte am Tag 2 einen Wert von ~20-45µm/sec und steigerte sich bis zum Tag 14 auf ~130-200µm/sec ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (Tabelle 4). Entsprechend nahm der mikrovaskuläre Blutfluss von 4-9pl/sec am 2. Tag bis auf 10-15pl/sec am 14. Tag zu (Tabelle 4).

	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Tag 14
Gefäßdurchmesser					
Kontrolle	15,6 ± 0,2	14,1 ± 0,5 ^a	11,9 ± 0,3 ^b	11,1 ± 0,4 ^b	11,2 ± 0,1 ^b
SU5416	16,8 ± 0,7	13,5 ± 0,5 ^a	12,4 ± 0,4 ^a	12,6 ± 0,5 ^a	10,8 ± 0,2 ^b
SU6668	17,6 ± 1,3	17,1 ± 1,7 [#]	17,1 ± 2,5 ^{*#}	16,7 ± 2,3 ^{*#}	15,8 ± 2,6 ^{*#}
Blutzellgeschwindigkeit					
Kontrolle	33,8 ± 6,4	118,8 ± 25,8 ^a	168,9 ± 30,3 ^a	141,7 ± 23,0 ^a	141,1 ± 11,8 ^a
SU5416	45,8 ± 12,3	70,0 ± 26,0	83,4 ± 21,4	104,2 ± 39,8	132,3 ± 56,1
SU6668	24,0 ± 8,2	138,7 ± 38,1	192,0 ± 20,6 ^a	168,4 ± 12,0 ^a	197,7 ± 38,4 ^a
Blutfluss					
Kontrolle	5,9 ± 1,6	12,1 ± 2,2	15,1 ± 2,4	12,6 ± 1,8	9,9 ± 1,0
SU5416	8,6 ± 0,8	10,1 ± 3,5	12,8 ± 1,7	14,4 ± 3,6	14,5 ± 4,0
SU6668	3,7 ± 1,3	16,0 ± 4,3 ^a	16,4 ± 1,6 ^a	12,9 ± 1,5	15,0 ± 2,8 ^a

Tabelle 4: Gefäßdurchmesser (µm), Blutzellgeschwindigkeit (µm/s) und mikrovaskulärer Blutfluss (pl/s) von Endometrium-Fragmenten nach Transplantation in die Rückenhautkammer Syrischer Goldhamster, denen täglich DMSO (Kontrolle), SU5416 oder SU6668 appliziert wurde. Mittelwerte ± SEM. *P<0,05 vs. Kontrolle; #P<0,05 vs. SU5416-behandelte Tiere; ^aP<0,05 vs. Tag 2; ^bP<0,05 vs. Tag 2 und 4.

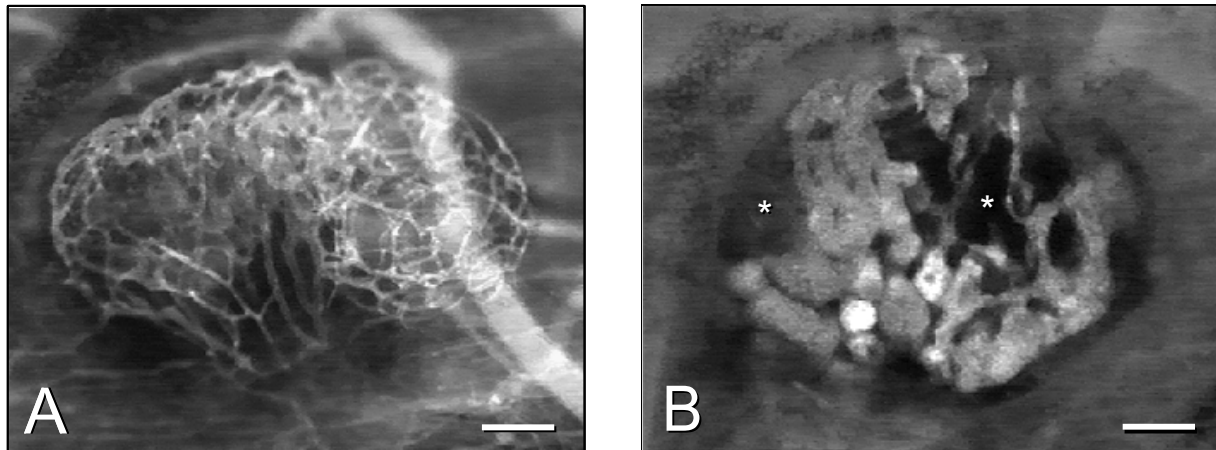


Abbildung 15: Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von revaskularisierten Endometrium-Fragmenten am Tag 7 nach Transplantation in die Rückenhautkammer Syrischer Goldhamster, denen DMSO (A, Kontrolle) bzw. SU6668 (B) appliziert wurde. A: Das Transplantat des Kontrolltieres ist bereits vollständig vaskularisiert und weist eine typische glomeruläre Gefäßnetzwerkstruktur auf. B: Dagegen sind im Transplantat des SU6668-behandelten Tieres noch avaskuläre Bereiche (Sternchen) sichtbar. Die neugebildeten Gefäße sind hier durch große Gefäßdurchmesser und sinusoidale Gefäßwandaussackungen charakterisiert (Kontrastverstärkung mit FITC-Dextran in Blaulicht-Epi-Illumination; A,B: – 150µm).

6.2.4. Histologie und Immunhistochemie

Histologisch konnten am 14. Tag nach Transplantation der Endometrium-Fragmente in die Rückenhautkammer in allen drei Gruppen typische Endometrioseherde mit Drüsen und vaskularisiertem Stroma nachgewiesen werden (*Abbildung 16*).

Durch den immunhistochemischen Nachweis von Desmin wurde gezeigt, dass die neugebildeten Gefäße in der Kontrollgruppe und in der SU5416-Gruppe von Perizyten umgeben waren, während diese Zellen in der SU6668-Gruppe nicht nachgewiesen werden konnten (*Abbildung 16*). Da sich Perizyten normalerweise zur Stabilisierung der Gefäßwand im Laufe der Angiogenese an neugebildete Blutgefäße anlagern, zeigt dieses Ergebnis, dass die Reifung neuer Gefäße durch die Behandlung mit SU6668 blockiert wurde.

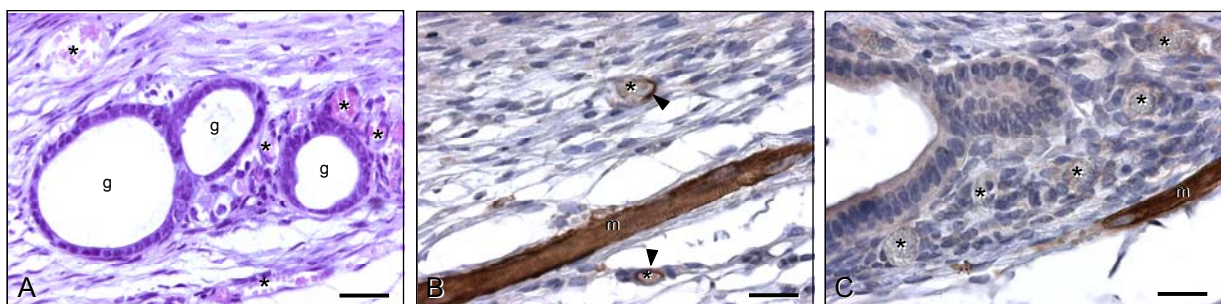


Abbildung 16: A: Histologisches Schnittpräparat eines Endometrium-Fragments am 14. Tag nach Transplantation in die Rückenhautkammer eines Kontrolltieres. Das Transplantat hat sich zu einem typischen Endometrioseherd entwickelt mit zystisch erweiterten Drüsen (g), die von vielen neuen Blutgefäßen (Sternchen) umgeben sind. B,C: Der immunhistochemische Nachweis von Desmin zeigt, dass die neuen Blutgefäße im Endometrioseherd des Kontrolltieres (B) genauso von Perizyten (Pfeilspitzen) umgeben sind wie die Blutgefäße des Empfängerorgans unterhalb des Rückenhaulmuskels (m), während die Gefäße (Sternchen) im Endometrioseherd eines SU6668-behandelten Tieres (C) keine Perizyten aufweisen (A: Hämatoxylin-Eosin-Färbung; B,C: Immunhistochemischer Nachweis von Desmin; A: – 120µm; B,C: – 80µm).

6.3. Einfluss des selektiven Cyclooxygenase-2-Inhibitors NS398

6.3.1. Entwicklung der Transplantate

Zu Beginn der Versuchreihe wiesen die Endometrium-Transplantate in der DMSO-behandelten Kontrollgruppe und in der NS398-behandelten Gruppe eine vergleichbare initiale Größe von $0,50 \pm 0,02 \text{ mm}^2$ bzw. $0,57 \pm 0,04 \text{ mm}^2$ auf. Während des Beobachtungszeitraums von 14 Tagen veränderte sich die Größe der Transplantate in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Ausgangsgröße nur geringfügig (*Abbildung 17*). Die Behandlung mit dem selektiven Cyclooxygenase-2-Inhibitor NS398 führte dagegen zu einer signifikanten Reduktion der Transplantatgröße auf ~57% der Ausgangsgröße (*Abbildung 17*).

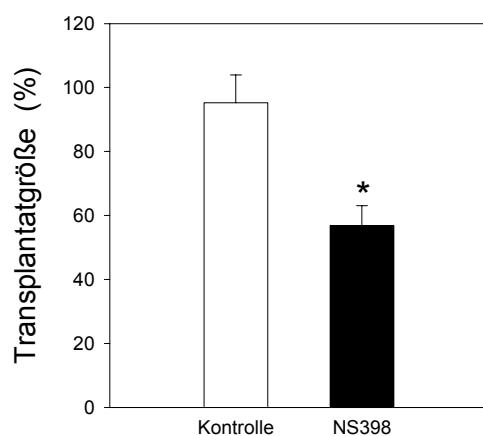


Abbildung 17: Transplantatgröße (in % der Ausgangsgröße) der Endometrium-Fragmente am Tag 14 nach Transplantation in die Rückenhautkammer von Syrischen Goldhamstern, denen täglich DMSO (Kontrolle) oder NS398 appliziert wurde. Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. Kontrolle.

6.3.2. Mikrovaskuläres Netzwerk

Die Entwicklung neuer Blutgefäße innerhalb der Endometrium-Fragmente begann in beiden Untersuchungsgruppen bereits am 2. Tag nach Transplantation in die Rückenhautkammer. Allerdings erfolgte die Revaskularisierung in den NS398-behandelten Tieren verzögert mit signifikant reduzierten Werten für die revaskularisierte Fläche am Tag 4 und 7 (*Abbildung 18*). Am Ende des Versuchs waren die Transplantate in beiden Gruppen zu ~90-100% vaskularisiert.

Daneben war in den NS398-behandelten Tieren auch die funktionelle Kapillardichte der neugebildeten Gefäßnetzwerke zwischen Tag 7 und 14 im Vergleich zu den DMSO-behandelten Kontrolltieren signifikant erniedrigt (*Abbildung 18*). So wiesen die Kontrolltiere am Tag 14 eine funktionelle Kapillardichte von $\sim 300 \text{ cm/cm}^2$ auf, die NS398-behandelten Tiere dagegen nur von $\sim 200 \text{ cm/cm}^2$.

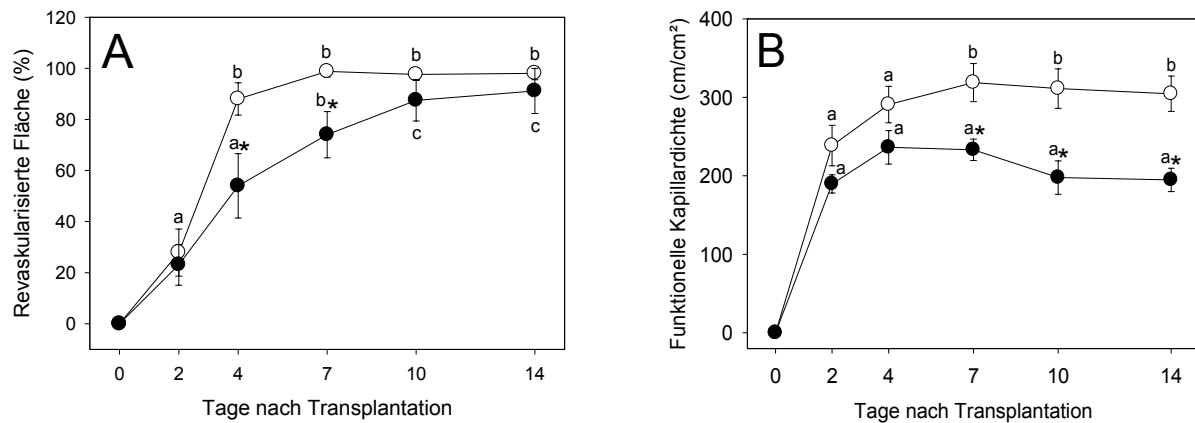


Abbildung 18: (A) Revaskularisierte Fläche (%) und (B) funktionelle Kapillardichte (cm/cm^2) von Endometrium-Fragmenten nach Transplantation in die Rückenhautkammer Syrischer Goldhamster, denen täglich DMSO (Kontrolle, ○) oder NS398 (●) appliziert wurde. Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. Kontrollgruppe; ^a $P < 0,05$ vs. Tag 0; ^b $P < 0,05$ vs. Tag 0 und 2; ^c $P < 0,05$ vs. Tag 0, 2 und 4.

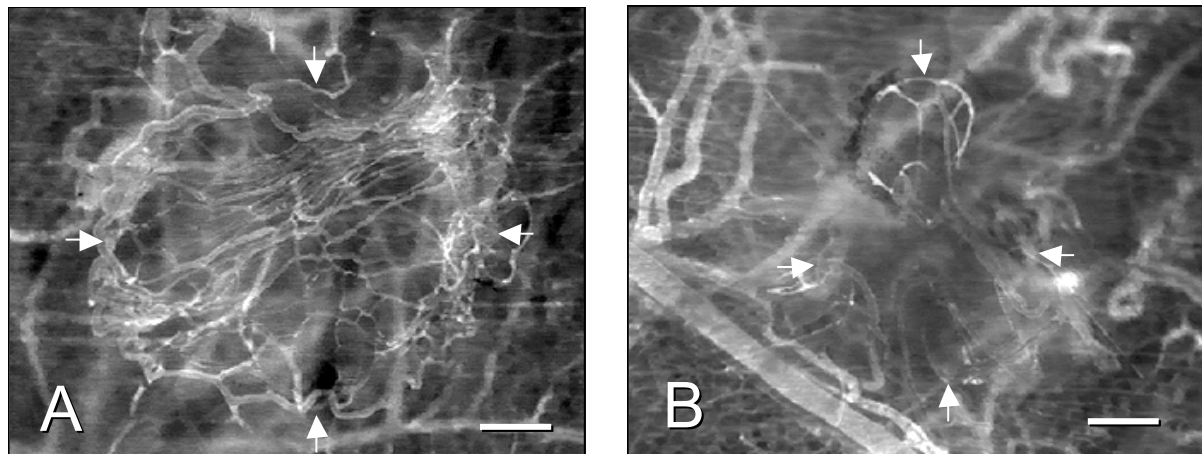


Abbildung 19: A,B: Intravitale Fluoreszenzmikroskopie von Endometrium-Fragmenten am Tag 14 nach Transplantation in die Rückenhautkammer Syrischer Goldhamster, die mit DMSO (A) oder NS398 (B) behandelt wurden. Die Pfeile kennzeichnen jeweils die Transplantatränder. A: Das Transplantat der Kontrollgruppe weist ein dicht vaskularisiertes Netzwerk auf. B: Die Behandlung mit NS398 führt zu einer deutlich verminderten revaskularisierten Fläche mit reduzierter Gefäßdichte (Kontrastverstärkung mit FITC-Dextran in Blaulicht-Epi-Illumination; A,B: — 80 μm).

6.3.3. Mikrohämodynamik

Die Kapillardurchmesser der neugebildeten Gefäße innerhalb der transplantierten Endometrium-Fragmente reduzierten sich in beiden Gruppen von $\sim 16\text{--}19\mu\text{m}$ am 2. Tag auf $\sim 11\text{--}13\mu\text{m}$ am 14. Tag (Tabelle 5). Die Blutzellgeschwindigkeit stieg in der Kontrollgruppe von $\sim 20\mu\text{m}/\text{s}$ am 2. Tag kontinuierlich auf $\sim 176\mu\text{m}/\text{s}$ am 14. Tag an (Tabelle 5). Im Vergleich dazu war die Blutzellgeschwindigkeit in der NS398-Gruppe am 4. und 7. Tag signifikant reduziert, erreichte jedoch am 14. Tag wieder einen vergleichbaren Wert von $\sim 170\mu\text{m}/\text{s}$ (Tabelle 5). Für den mikrovaskulären Blutfluss konnte ein Anstieg von $\sim 4\text{pl}/\text{s}$ am 2. Tag auf $\sim 14\text{--}17\text{pl}/\text{s}$ am 14. Tag ohne signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen errechnet werden (Tabelle 5).

	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Tag 14
Gefäßdurchmesser					
NS398	18,7 ± 1,1	16,1 ± 0,7	13,8 ± 0,5 ^{a*}	12,9 ± 0,5 ^a	13,1 ± 0,8 ^a
Kontrolle	16,2 ± 0,8	14,7 ± 0,6	11,8 ± 0,3 ^b	11,6 ± 0,4 ^b	11,3 ± 0,2 ^b
Blutzellgeschwindigkeit					
NS398	21,2 ± 8,1	61,3 ± 10,7 [*]	131,9 ± 10,3 ^{b*}	182,5 ± 14,7 ^c	170,8 ± 19,9 ^b
Kontrolle	24,2 ± 6,6	142,1 ± 33,4 ^a	197,9 ± 13,8 ^a	179,6 ± 16,3 ^a	176,5 ± 16,3 ^a
Blutfluss					
NS398	4,1 ± 1,4	9,6 ± 1,8	14,6 ± 1,4 ^a	17,6 ± 1,3 ^b	16,7 ± 1,4 ^b
Kontrolle	4,0 ± 1,1	17,3 ± 3,6 ^a	16,5 ± 1,4 ^a	14,9 ± 2,1 ^a	13,7 ± 1,4 ^a

Tabelle 5: Gefäßdurchmesser (μm), Blutzellgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$) und mikrovaskulärer Blutfluss (pl/s) von Endometrium-Fragmenten nach Transplantation in die Rückenhautkammer Syrischer Goldhamster, denen täglich DMSO (Kontrolle) oder NS398 appliziert wurde. Mittelwerte \pm SEM. ^{*} $P < 0,05$ vs. Kontrolle; ^a $P < 0,05$ vs. Tag 2; ^b $P < 0,05$ vs. Tag 2 und 4; ^c $P < 0,05$ vs. Tag 2, 4 und 7.

6.3.4. Western Blot

Die Western Blot Analyse zeigte, dass in den Endometrium-Fragmenten der NS398-Gruppe die Expression des Proliferationsmarkers PCNA und des pro-angiogenen Wachstumsfaktors VEGF am 2. und 14. Tag nach Transplantation in die Rückenhautkammer im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert waren (*Abbildung 20*).

Daneben führte die Behandlung mit dem selektiven Cyclooxygenase-2-Inhibitor NS398 am 2. Tag zu einer signifikant gesteigerten Expression der aktivierten Caspase-3, während die Expression der Caspase-3 in beiden Gruppen vergleichbar war (*Abbildung 20*). Dieses Ergebnis weist nach, dass die Endometrium-Fragmente, die mit dem Cyclooxygenase-2-Inhibitor behandelt wurden, im Vergleich zur Kontrollgruppe initial einen höheren Anteil an apoptotischen Zellen aufwiesen. Nach 14 Tagen konnte in den Endometrium-Fragmenten der NS398-Gruppe jedoch nur noch eine sehr geringe Expression der aktivierten Caspase-3 nachgewiesen werden, die sich zu diesem Zeitpunkt nicht mehr von der Kontrollgruppe unterschied (*Abbildung 20*).

6.3.5. Histologie

Die histologischen Untersuchungen der Rückenhautkammer-Präparationen der Kontroll- und NS398-behandelten Tiere zeigten, dass sich aus den Endometrium-Transplantaten am Tag 14 typische Endometrioseherde mit zystisch erweiterten Drüsenformationen und einem stark vaskularisierten Stroma entwickelt hatten (*Abbildung 21*). Histomorphologisch konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden.

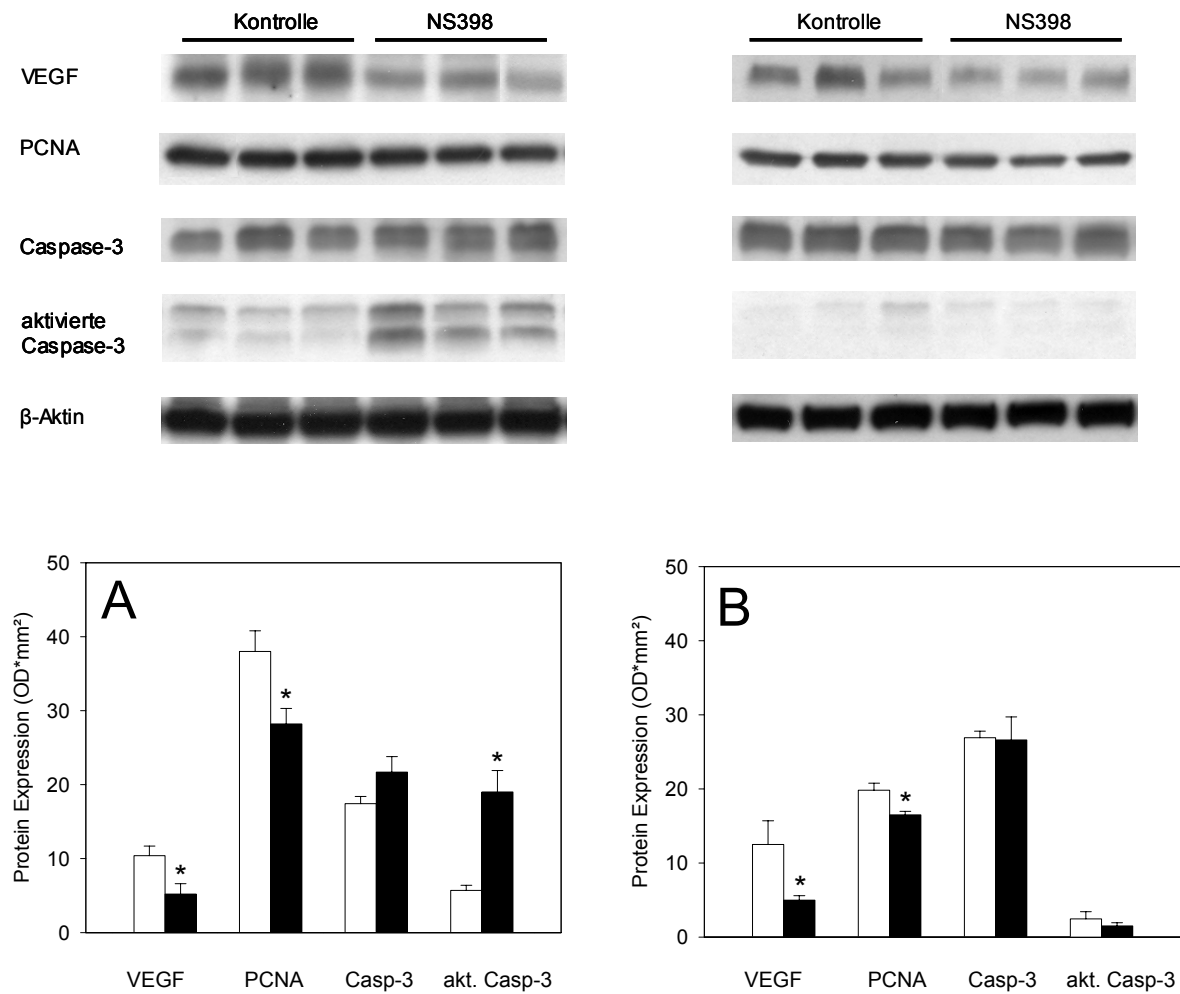


Abbildung 20: A,B: Western Blot Analyse der Expression (optische Dichte * mm²) von VEGF, PCNA, Capase-3 und aktivierter Caspase-3 in Endometrium-Fragmenten am Tag 2 (A) und Tag 14 (B) nach Transplantation in die Rückenhautkammer von hormonell synchronisierten Syrischen Goldhamstern, die entweder mit DMSO (Kontrolle, weiße Balken) oder NS398 (schwarze Balken) behandelt wurden. Mittelwerte ± SEM; *P<0,05 vs. Kontrolle.

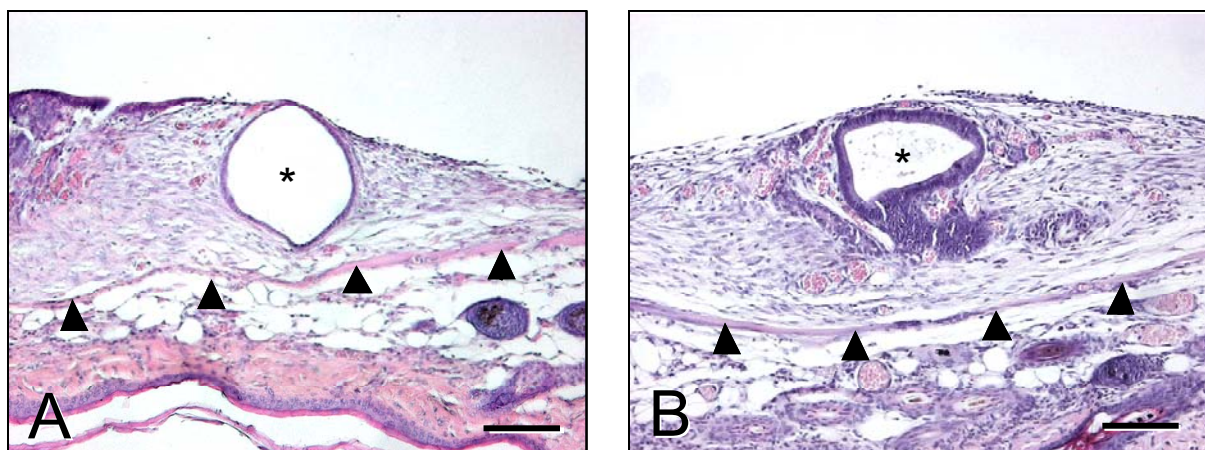


Abbildung 21: A,B: Histologische Schnittpräparate von Endometrium-Fragmenten am Tag 14 nach Transplantation auf die quergestreifte Muskulatur (Pfeilspitzen) in der Rückenhautkammer eines DMSO-behandelten Kontrolltieres (A) und eines Syrischen Goldhamsters, der mit NS398 behandelt wurde (B). In beiden Schnitten sieht man typische Endometrioseherde mit zystisch erweiterten Drüsen (Sternchen), die von einem vaskularisierten Stroma umgeben sind (A,B: Hämatoxylin-Eosin-Färbung; A,B: — 120µm).

6.4. Einfluss des Immunsuppressivums Rapamycin

6.4.1. Entwicklung der Transplantate

Die transplantierten Endometrium-Fragmente hatten in der Kontrollgruppe und in der Rapamycin-behandelten Gruppe am Tag der Transplantation eine vergleichbare Ausgangsgröße von $0,49 \pm 0,02 \text{ mm}^2$ und $0,52 \pm 0,07 \text{ mm}^2$. Während sich die Transplantatgröße in der Kontrollgruppe im Beobachtungszeitraum von 14 Tagen nicht veränderte, führte die Behandlung der Tiere mit dem Immunsuppressivum Rapamycin zu einer signifikanten Größenreduktion der Endometrium-Transplantate auf ~52% der Ausgangsgröße (Abbildung 22 und 24).

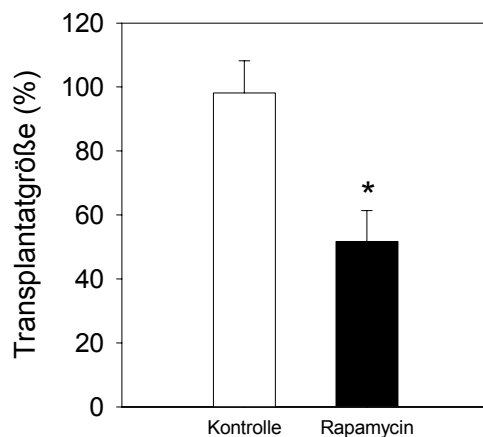


Abbildung 22: Transplantatgröße (in % der Ausgangsgröße) der Endometrium-Fragmente am Tag 14 nach Transplantation in die Rückenhautkammer von Syrischen Goldhamstern, denen täglich DMSO (Kontrolle) oder Rapamycin appliziert wurde. Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. Kontrolle.

6.4.2. Mikrovaskuläres Netzwerk

In beiden experimentellen Gruppen konnte die Entwicklung neuer Blutgefäße in den transplantierten Endometrium-Fragmenten beobachtet werden. Bereits am 2. Tag nach Transplantation bildeten sich ausgehend von den Kapillaren und Venolen der Rückenhautmuskulatur Gefäßsprossen aus, die in die Transplantate einwuchsen und dort schließlich zur Ausbildung neuer mikrovaskulärer Netzwerke führten.

Am 7. Tag waren die Endometrium-Transplantate beider Gruppen zu 100% revaskularisiert (Abbildung 23). Interessanterweise führte jedoch die Behandlung mit dem Immunsuppressivum Rapamycin in den Folgetagen wieder zu einer leichten Regression der Gefäßnetzwerke innerhalb der Transplantate mit einer im Vergleich zur DMSO-behandelten Kontrollgruppe signifikant reduzierten revaskularisierten Fläche von 87% am Tag 14 (Abbildung 23). Zusätzlich wiesen die Gefäßnetzwerke in den Rapamycin-behandelten Tieren eine signifikant reduzierte funktionelle Kapillardichte von 170 cm/cm^2 im Vergleich zur Kontrollgruppe (300 cm/cm^2) auf (Abbildung 23 und 24).

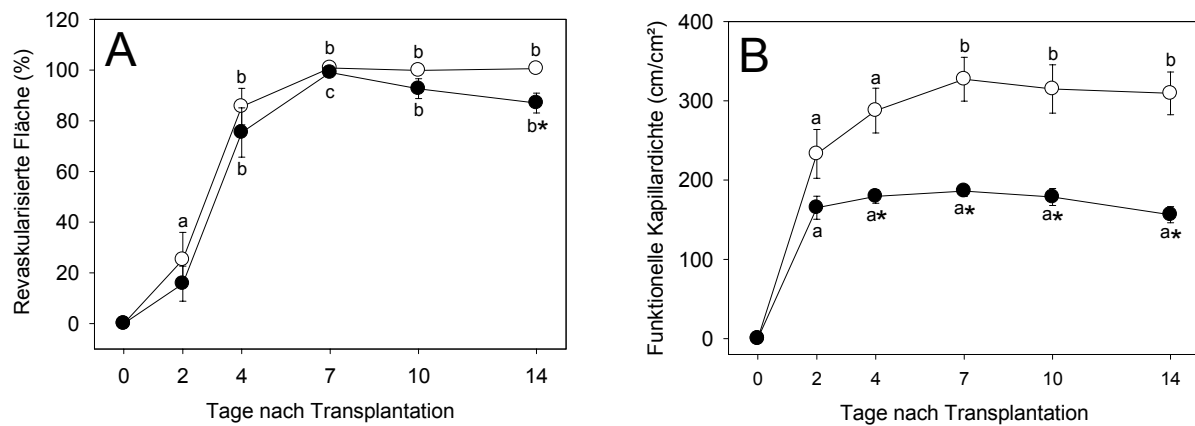


Abbildung 23: (A) Revaskularisierte Fläche (%) und (B) funktionelle Kapillardichte (cm/cm^2) von Endometrium-Fragmenten nach Transplantation in die Rückenhautkammer Syrischer Goldhamster, denen täglich DMSO (Kontrolle, ○) oder Rapamycin (●) appliziert wurde. Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. Kontrollgruppe; ^a $P < 0,05$ vs. Tag 0; ^b $P < 0,05$ vs. Tag 0 und 2; ^c $P < 0,05$ vs. Tag 0, 2 und 4.

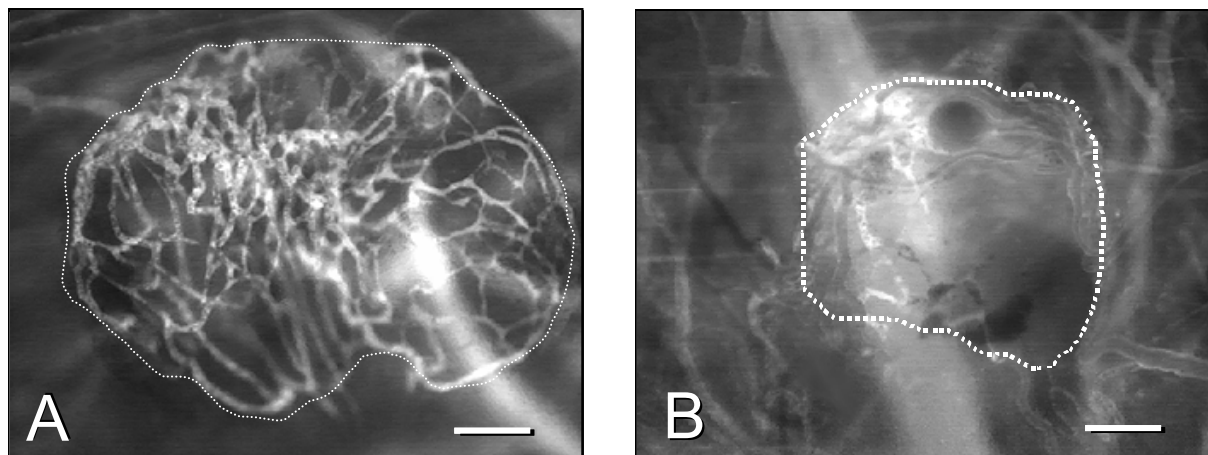


Abbildung 24: A,B: Intravitale Fluoreszenzmikroskopie von Endometrium-Fragmenten am Tag 14 nach Transplantation in die Rückenhautkammer Syrischer Goldhamster, die mit DMSO (A) oder Rapamycin (B) behandelt wurden. Die gestrichelten Linien kennzeichnen jeweils die Transplantatränder. A: Das Transplantat der Kontrollgruppe weist ein dicht vaskularisiertes Netzwerk auf. B: Die Behandlung mit Rapamycin führt zu einer deutlich verminderten Transplantatgröße mit reduzierter Netzwerkfläche und Gefäßdichte (Kontrastverstärkung mit FITC-Dextran in Blaulicht-Epi-Illumination; A,B: — 60 μm).

6.4.3. Mikrohämodynamik

In beiden Gruppen wiesen die neugebildeten Gefäße innerhalb der Endometrium-Transplantate einen Gefäßdurchmesser von $\sim 16\text{--}17\mu\text{m}$ am 2. Tag auf (Tabelle 6). In den Folgetagen kam es in der Kontrollgruppe zu einer kontinuierlichen Reduktion der Gefäßdurchmesser auf $\sim 11\mu\text{m}$ am Tag 14. Im Gegensatz dazu blieben die Gefäßdurchmesser in der Rapamycin-Gruppe zwischen Tag 7 und 14 signifikant erhöht (Abbildung 25). Die Blutzellgeschwindigkeit zeigte einen Anstieg von $\sim 20\text{--}50\mu\text{m}/\text{s}$ am 2. Tag auf $\sim 180\text{--}220\mu\text{m}/\text{s}$ am 14. Tag ohne signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen (Tabelle 6). Die errechneten Werte für den mikrovaskulären Blutfluss reichten in der Kontrollgruppe von 3pl/s am 2. Tag bis 14pl/s am 14. Tag (Tabelle 6). Dagegen führte die Behandlung mit Rapamycin am

Tag 14 zu einem erhöhten mikrovaskulären Blutfluss von ~22pl/s.

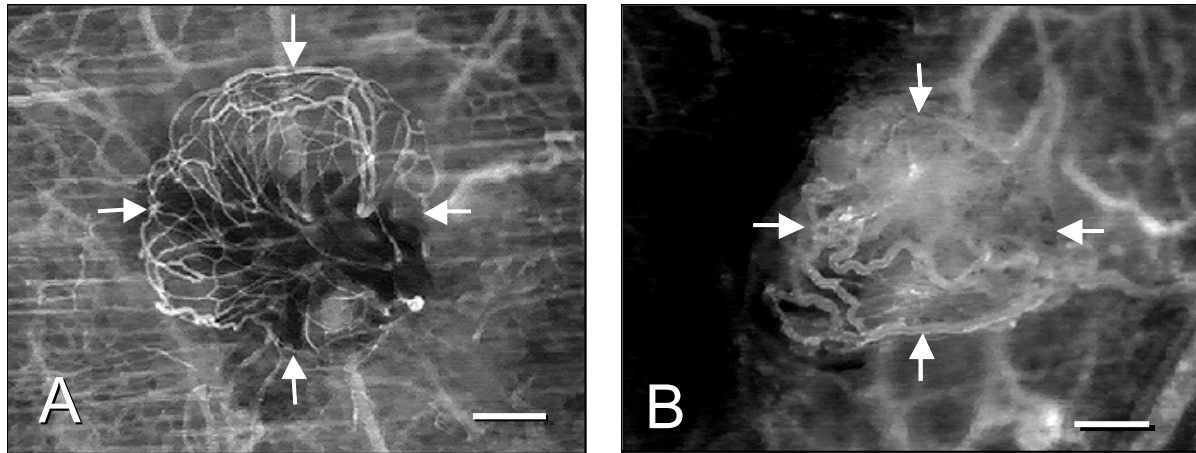


Abbildung 25: A,B: Intravitale Fluoreszenzmikroskopie von Endometrium-Fragmenten am Tag 14 nach Transplantation in die Rückenhautkammer Syrischer Goldhamster, die mit DMSO (A) oder Rapamycin (B) behandelt wurden. Die Pfeile kennzeichnen jeweils die Transplantatränder. A: Das Transplantat der Kontrollgruppe weist ein dicht vaskularisiertes Netzwerk mit relativ kleinen Gefäßdurchmessern auf. B: Die Behandlung mit Rapamycin führt zu einer deutlichen Vergrößerung der Gefäßdurchmesser am Tag 14 (Kontrastverstärkung mit FITC-Dextran in Blaulicht-Epi-Illumination; A,B: – 100µm).

	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Tag 14
Gefäßdurchmesser					
Rapamycin	16,8 ± 1,0	15,3 ± 0,4 ^a	14,1 ± 0,4 ^{a*}	13,9 ± 0,8 ^{a*}	13,1 ± 0,4 ^{a*}
Kontrolle	16,2 ± 1,0	14,8 ± 0,7	11,7 ± 0,3 ^b	11,5 ± 0,4 ^b	11,3 ± 0,2 ^b
Blutzellgeschwindigkeit					
Rapamycin	46,4 ± 18,9	95,3 ± 10,1	172,8 ± 16,4 ^b	238,7 ± 22,8 ^c	215,6 ± 28,3 ^b
Kontrolle	17,7 ± 2,4	117,9 ± 28,2 ^a	190,8 ± 14,4 ^a	179,0 ± 19,9 ^a	181,7 ± 19,0 ^a
Blutfluss					
Rapamycin	6,5 ± 2,0	12,8 ± 1,5 ^a	21,3 ± 2,2 ^b	27,9 ± 5,5 ^b	22,2 ± 1,9 ^{b*}
Kontrolle	3,0 ± 0,6	14,7 ± 3,0 ^a	15,6 ± 1,3 ^a	14,7 ± 2,6 ^a	14,2 ± 1,6 ^a

Tabelle 6: Gefäßdurchmesser (µm), Blutzellgeschwindigkeit (µm/s) und mikrovaskulärer Blutfluss (pl/s) von Endometrium-Fragmenten nach Transplantation in die Rückenhautkammer Syrischer Goldhamster, denen täglich DMSO (Kontrolle) oder Rapamycin appliziert wurde. Mittelwerte ± SEM. *P<0,05 vs. Kontrolle; ^aP<0,05 vs. Tag 2; ^bP<0,05 vs. Tag 2 und 4; ^cP<0,05 vs. Tag 2, 4 und 7.

6.4.4. Aorten-Ring-Assay

Mit Hilfe des durchgeführten Aorten-Ring-Assays konnten die intravitalmikroskopischen Ergebnisse betätigt werden. So zeigte sich, dass auch *in vitro* die Entwicklung neuer Blutgefäße durch das Immunsuppressivum Rapamycin inhibiert werden konnte. Im Vergleich zur Kontrolle führte die Inkubation von Aorten-Ringen mit Rapamycin zu einer signifikant reduzierten Fläche und Maximallänge neugebildeter Gefäßsprossen am Tag 7 nach Einbettung der Aorten-Ringe in das Matrigel (Abbildung 26).

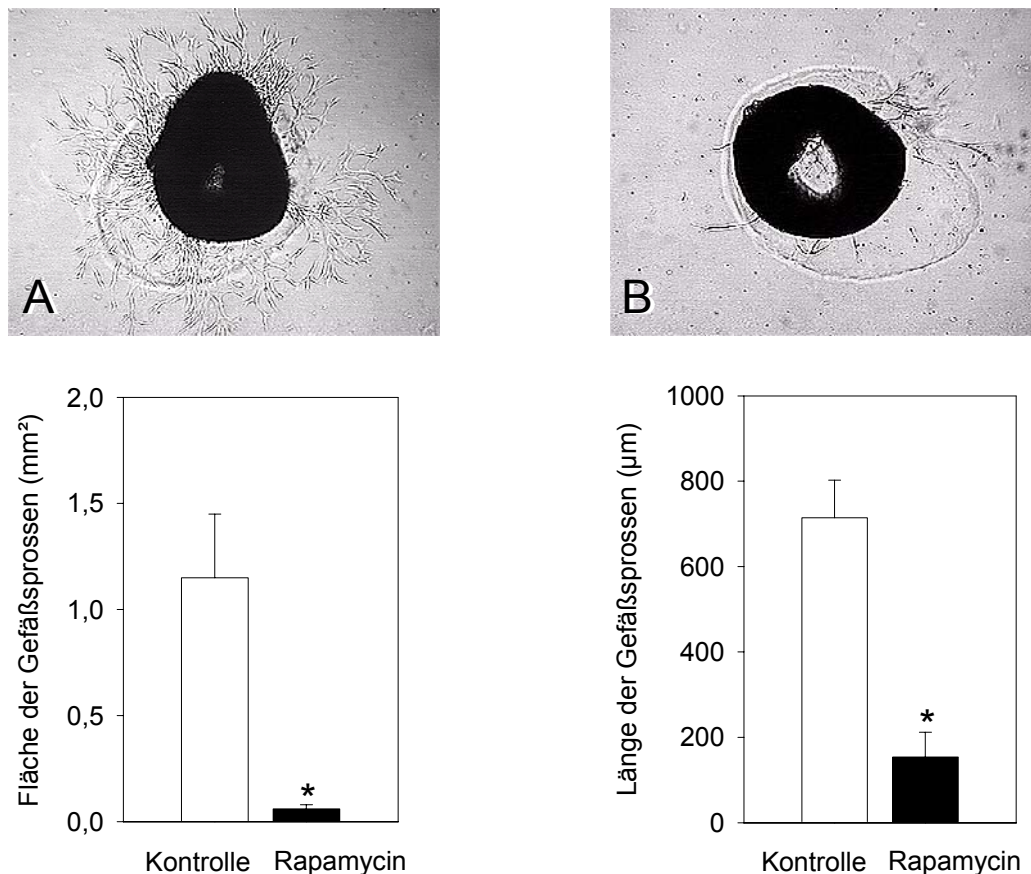


Abbildung 26: A,B: Repräsentative Aufnahmen von Aorten-Ringen mittels Phasen-Kontrastmikroskop, die für 7 Tage in DMSO- (A) oder Rapamycin-haltigem Medium (B) inkubiert wurden. Quantitative Analyse der Gesamtfläche (mm²) und Maximallänge (µm) der Gefäßsprossen, die aus den Aorten-Ringen in das umliegende Matrigel einwuchsen. Mittelwerte \pm SEM; * $P < 0,05$ vs. Kontrolle.

6.4.5. Western Blot

Die Western Blot Analyse zeigte, dass in Endometrium-Fragmenten, die in Rapamycin-haltigem DMEM kultiviert wurden, die Expression von PCNA und VEGF im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert war (Abbildung 27).

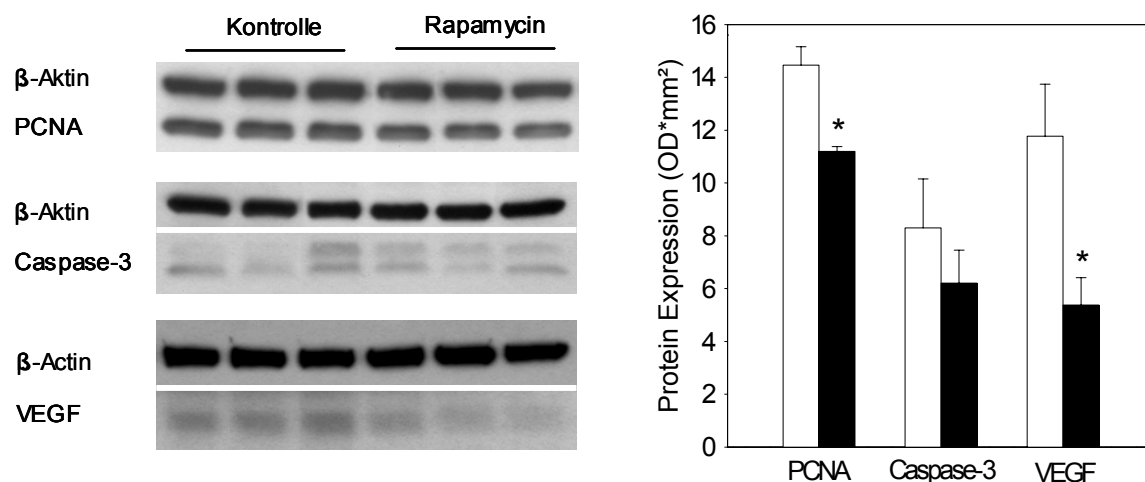


Abbildung 27: Western Blot Analyse der Expression (optische Dichte * mm²) von PCNA, Caspase-3 und VEGF in Endometrium-Fragmenten, die für 48h in DMSO-haltigem (Kontrolle, weiße Balken) oder Rapamycin-haltigem (schwarze Balken) DMEM kultiviert wurden. Mittelwerte \pm SEM; * $P < 0,05$ vs. Kontrolle.

6.4.6. Histologie und Immunhistochemie

Die histologischen Untersuchungen der Rückenhautkammer-Präparationen der Kontroll- und Rapamycin-behandelten Tiere zeigten, dass sich aus den Endometrium-Transplantaten am Tag 14 typische Endometrioseherde mit zystisch erweiterten Drüsenformationen und einem stark vaskularisierten Stroma entwickelt hatten (*Abbildung 28*). Die neugebildeten Blutgefäße innerhalb der Herde wiesen eine normale Histomorphologie mit einem intakten Gefäßendothel auf. Sie waren regelrecht mit Erythrozyten perfundiert. Mikrothromben oder Fibrinansammlungen innerhalb der Gefäße waren nicht nachzuweisen.

Durch die immunhistochemische Färbung von PCNA konnten viele proliferierende Stroma- und Endothelzellen in den Endometrioseherden der Kontrollgruppe nachgewiesen werden (*Abbildung 28*). Dagegen wiesen die Endometrioseherde der Rapamycin-behandelten Gruppe nur wenige proliferierende Zellen auf, die überwiegend im Stroma lokalisiert waren (*Abbildung 28*).

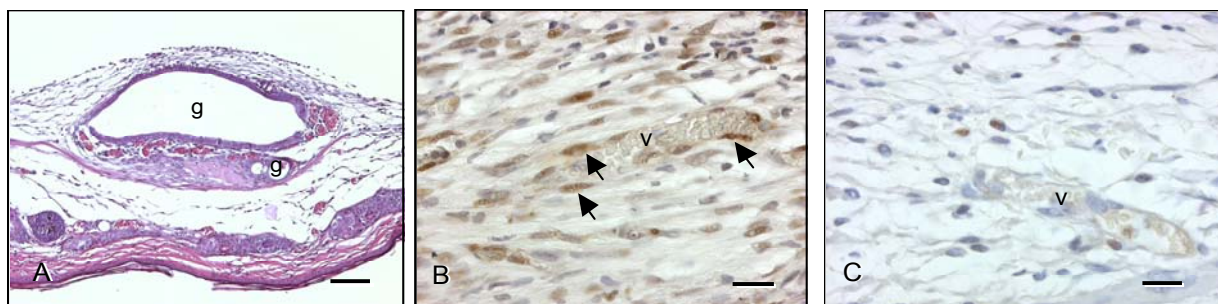


Abbildung 28: A: Histologisches Schnittpräparat eines Endometrium-Fragments am Tag 14 nach Transplantation auf die quergestreifte Muskulatur in der Rückenhautkammer eines Rapamycin-behandelten Syriscen Goldhamsters. Man sieht einen typischen Endometrioseherd mit zystisch erweiterten Drüsen (g), die von einem vaskularisierten Stroma umgeben sind. B,C: Immunhistochemischer Nachweis von PCNA innerhalb eines Endometrioseherdes eines Kontrolltiers (B) und eines Rapamycin-behandelten Tieres (C) am 14. Untersuchungstag. Im Kontrolltier sind viele proliferierende Endothelzellen (Pfeile) in der Wand eines neugebildeten Gefäßes und im umliegenden Stroma sichtbar. Im Gegensatz dazu sind im Rapamycin-behandelten Tier nur wenige proliferierende Zellen sichtbar (A: Hämatoxylin-Eosin-Färbung; B,C: Immunhistochemischer Nachweis von PCNA; A: – 200µm; B,C: – 30µm).

6.5. Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden experimentellen *in vivo* Studie wurde ein neues Modell zur Analyse der Angiogenese in Endometrioseherden, durch die Transplantation von Endometriumgewebe in die Rückenhautkammer Syrischer Goldhamster etabliert. Folgende Ergebnisse über den Ablauf und die Steuerung der Angiogenese im Endometriumgewebe konnten erarbeitet werden:

1. Die Ausbildung, der für die Endometriose typischen glomerulum-artigen Gefäßnetzwerke läuft in charakteristischen Entwicklungsstufen ab. Bereits am 2. Tag nach Transplantation von Endometrium in die Rückenhautkammer ist eine beginnende Angiogenese durch erweiterte Gefäßsinusoide und Aussprossung der Endothelzellen sowie die Bildung

neuer einzelner Blutgefäße erkennbar. Gekennzeichnet durch die Abnahme der Gefäßdurchmesser und die Zunahme der funktionellen Kapillardichte entstehen im Folgenden neue kapilläre Netzwerke, die eine charakteristische glomerulum-artige Struktur entwickeln und über Anastomosen mit den Blutgefäßen des Empfängergewebes versorgt werden. Eine vermehrte Leukozytenakkumulation und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion ist innerhalb der Transplantate nicht erkennbar.

2. Die Revaskularisierung großer und kleiner Transplantate ist innerhalb weniger Tage abgeschlossen. Hierbei kann kein signifikanter Unterschied der Größenentwicklung gefunden werden. Interessanterweise ist der mikrovaskuläre Blutfluss in großen Transplantaten höher als in kleinen Transplantaten. Bei der Transplantation in unterschiedlich vorbehandelte Empfängertiere (unbehandelte, synchronisierte und ovariectomierte Syrische Goldhamster) wurden jedoch deutliche Unterschiede sichtbar. Während die Entwicklung der Endometrioseherde in den unbehandelten und synchronisierten Tieren ähnlich verläuft, kann in den ovariectomierten Tieren eine verzögerte Revaskularisierung der Transplantate in den ersten Entwicklungstagen festgestellt werden. Sie ist durch eine erniedrigte funktionelle Kapillardichte und Blutzellgeschwindigkeit sowie mikrovaskulären Blutfluss gekennzeichnet.

3. Neue Gefäße entstehen unter dem Einfluss von pro-angiogenen Substanzen. Während in der vorliegenden Arbeit durch eine selektive Blockade von VEGF (SU5416) nur eine mäßige Inhibition der Angiogenese in Endometrioseherden erreicht werden konnte, führte die kombinierte Blockade (SU6668) von VEGF, FGF und PDGF zu einer signifikanten Reduktion der Transplantatgröße, der revaskularisierten Fläche sowie der funktionellen Kapillardichte. Des Weiteren wurde mit dieser Behandlung auch die Ausreifung neugebildeter Blutgefäße gehemmt, welches sich an signifikant erhöhten Gefäßdurchmessern und der Abwesenheit von Gefäßwand stabilisierenden Perizyten zeigte.

4. Die selektive Inhibition der Cyclooxygenase-2 führt zu einer Reduktion der Angiogenese in den Endometrioseherden. Dies bewirkt eine deutliche Verkleinerung der Transplantatgröße. Hierbei ist die Expression von VEGF und PCNA im Endometrium reduziert, während die Expression von Caspase-3 gesteigert ist.

5. Die Behandlung von Endometrioseherden mit dem Immunsuppressivum Rapamycin führt zu einer Inhibition der Angiogenese mit einer signifikant reduzierten funktionellen Kapillardichte. Des Weiteren hemmt Rapamycin die Zellproliferation, was zu einer deutlichen Größenreduktion der Herde führt.

7. Diskussion

7.1. Diskussion von Material und Methoden

7.1.1. Diskussion des Modells

Der Prozess der Angiogenese kann in verschiedenen tierexperimentellen Modellen analysiert werden. Dabei stellt die Implantation von „Beobachtungskammern“ eine der ältesten Methoden dar, die bisher zur Untersuchung und Quantifizierung angiogener Prozesse in Maus, Ratte und Hamster genutzt wurden [Algire 1943; Greenblatt und Shubik 1968]. Mit Hilfe der Kammermodelle in Kombination mit der Technik der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie ist es möglich, die Mikrozirkulation verschiedener Organe und Gewebe wie Hirn, Herz, Lunge, Leber, Milz, Pankreas, Darm, Muskel und Knochen zu untersuchen [Wahl et al., 1985; Winet, 1989; Schmidt et al., 1990; Menger et al., 1992b; Lehr et al., 1993; Vollmar et al., 1995; Menger et al., 1996; Kuelbler et al., 1997; Vollmar et al., 1998].

Bei der Einteilung von tierexperimentellen Modellen kann man generell sogenannte Akut-Modelle von chronischen Modellen unterscheiden. Zu den Akut-Modellen zählt das Mesenterialfenster-Modell, bei dem das terminale Gefäßbett des Mesenteriums dargestellt und untersucht wird [Zweifach, 1973]. Weitere Akut-Experimente können am Omentum der Katze [Intaglietta et al., 1970], am Cremastermuskel der Ratte [Prewitt und Johnson, 1976; Thorlacius et al., 1997; Ley et al., 1998; Yamaki et al., 1998] oder der Backentasche des Hamsters [Duling, 1973] durchgeführt werden. Diese Experimente dienen häufig zur Analyse der Wirkung von pharmakologischen Stimuli auf die Mikrozirkulation [Costa et al., 1994; Norrby, 1994; Wilson und Baldwin, 1998]. Vorteil dabei ist, dass auf Grund der Dünne der präparierten Gewebeschicht ein Lichtmikroskop verwendet werden kann [Jakobsson et al., 1994], und dass das Gewebe zur intravitalmikroskopischen Untersuchung leicht zugänglich ist. Ein wesentlicher Nachteil der Akut-Modelle ist jedoch die kurze Beobachtungszeit, die nur auf wenige Stunden beschränkt ist. Des Weiteren können die Narkose des Versuchstiers [Menger und Lehr, 1993] und das chirurgische Trauma der Gewebepräparation [Fiebig et al., 1991] zur Beeinträchtigung von gemessenen mikrohämodynamischen Parametern, wie Kapillardurchmesser und Blutfluss, führen [Yamauchi et al., 1999].

Zu Beginn des zwanzigsten Jahrhunderts wurden erstmalig chronische Untersuchungen mit Beobachtungskammern durchgeführt. So beschrieb Sandison bereits 1924 ein Kammer-Modell am Kaninchenohr. Dieses Modell wurde später von Algire (1943) noch weiterentwickelt. Ein wesentlicher Nachteil dieser frühen Kammer-Modelle war die Tatsache,

dass damit vorwiegend Granulationsgewebe untersucht wurde, welches sich in den Kammern ausbildete. In den neueren Kammer-Modellen werden die analysierten Parameter weder durch das Kammermaterial selbst, noch durch die Implantation der Kammer beeinflusst [Menger et al., 2002]. Die Kammer wird hierbei in die Rückenhautfalte von Mäusen, Ratten und Hamstern implantiert [Papenfuss et al., 1979; Lehr et al., 1993; Torres Filho et al., 1995; Endrich et al., 1980]. Die Erstbeschreibung der Rückenhautkammer am Syrischen Goldhamster erfolgte durch Endrich et al. im Jahre 1980. Durch die Präparation des quergestreiften Unterhautmuskels (*Musculus panniculus carnosus*) ist es mit diesem Modell möglich, mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie die gesamte Mikrozirkulation bestehend aus terminalen Arteriolen, nutritiven Kapillaren, postkapillaren Venolen und Sammelvenolen darzustellen und quantitativ zu analysieren. Die Ergebnisse der mikrohämodynamischen Analysen entsprechen dabei den Ergebnissen aus Untersuchungen an anderen Modellen [Burton und Johnson, 1972; Endrich et al., 1980].

Rückenhautkammern bestehen heute aus symmetrischen Titanrahmen, die sich durch ein geringes Gewicht und eine hohe Gewebeverträglichkeit auszeichnen [Menger et al., 2002]. Entsprechend kann die Belastung der Versuchstiere auf ein geringes Maß reduziert werden. Nach der Implantation der Kammer können sich die Tiere in der Regel für 2-3 Tage erholen, bevor mit den eigentlichen Untersuchungen begonnen wird, um so einen negativen Einfluss des chirurgischen Traumas der Kammerpräparation auf die analysierten Parameter auszuschließen [Yamauchi et al., 1999]. Generell bietet das Modell den großen Vorteil, dass durch die Entfernung des Deckglases die Möglichkeit besteht, verschiedene Gewebearten in die Rückenhautkammer zu transplantieren und deren Neovaskularisierung über einen Beobachtungszeitraum von 2-3 Wochen zu untersuchen. Daher ist dieses Modell in besonderem Maß zur Erforschung von angiogenen Prozessen geeignet [Asaishi et al., 1981; Endrich et al., 1982; Reinhold und Endrich, 1986]. Entsprechend wurde damit bereits die Vaskularisierung von Tumoren, Knochen, Langerhans'schen Inseln, ovariellen Follikeln und implantierten Biomaterialien untersucht [Funk et al., 1986; Menger et al., 1990; Leunig et al., 1999; Vajkoczy et al., 2000; Kraft et al., 2000; Laschke et al., 2005 und 2008a, Rücker et al., 2008].

In der vorliegenden Arbeit wurde das Rückenhautkammer-Modell erstmalig dazu genutzt, um die Angiogenese in Endometrioseherden zu analysieren. Bisherige Studien zur Endometriose wurden dagegen meistens im Modell der intraperitonealen Endometriose durchgeführt [Vernon und Wilson, 1985; Matsuzaki et al., 2004; Dogan et al., 2004; Becker et al., 2005]. Hierbei werden isolierte Endometrium-Fragmente an das Peritoneum der Bauchwand fixiert, die dann dort anwachsen und typische Endometrioseherde ausbilden. Diese

können bezüglich ihrer Größenentwicklung und Histomorphologie analysiert werden. Interessanterweise kann durch Einsatz von immundefizienten Mäusen auf diese Weise auch implantiertes humanes Endometrium untersucht werden [Awwad et al., 1999; Grümmer et al., 2001, Bruner et al., 1997; Eggermont et al., 2005; Hull et al., 2005]. Viele Studien, die am Modell der intraperitonealen Endometriose bisher durchgeführt wurden, beschäftigten sich auch mit der Angiogenese in Endometrioseherden [Benjamin et al., 1998; Hull et al., 2003; Nap et al., 2004; Becker et al., 2005 und 2006; Dogan et al., 2004; Matsuzaki et al., 2004]. Allerdings konnte dabei der Prozess der Gefäßneubildung nur „invasiv“, d.h. durch Entnahme von Gewebeproben und deren histologische Aufarbeitung, untersucht werden. Auf Grund dieses Nachteils kombinierten Becker et al. (2006) die Technik der Biolumineszenz mit dem Modell der intraperitonealen Endometriose, um auf diese Weise die Angiogenese in den Herden auch nicht-invasiv und repetitiv untersuchen zu können. Allerdings bietet diese Methode auf Grund ihrer Auflösung nicht die Möglichkeit, die Entwicklung einzelner Blutgefäße im Detail zu visualisieren. Daneben sind hämodynamische Messungen nicht möglich.

Alternativ zum Modell der intraperitonealen Endometriose kann auch das Modell der Chorioallantoismembran dazu genutzt werden, um die Entwicklung neuer Gefäße in ektopem Endometrium-Gewebe zu untersuchen [Malik et al., 2000; Maas et al., 2001; Nap et al., 2003 und 2004]. So bilden sich im Rahmen der Entwicklung eines Hühnerembryos vier Fruchthüllen (Amnion, Dottersack, Allantois und Chorion) im Hühnerei aus [Rüsse, 1998]. Zunächst entwickelt sich die Allantois am 3. Bebrütungstag aus dem Endoderm. Diese Eihülle weitet sich bis zum 10. Tag dann zur Allantoisblase aus, wobei die mesodermale Schicht der Allantois mit der mesodermalen Schicht des Chorions fusioniert und so die sogenannte Chorioallantoismembran ausbildet. Darin entwickelt sich ein Gefäßnetzwerk [Ribatti et al., 2001], welches mit dem Hühnerembryo in Verbindung steht und diesen mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Nach Eröffnung des Hühnereis können auf diese Membran zwischen dem 5. und 15. Bebrütungstag sowohl solide Gewebefragmente als auch flüssige Faktoren mit pro- bzw. anti-angiogener Wirkung aufgebracht und analysiert werden [Ribatti et al., 1996, 2000; Nguyen et al., 1994; Sheu et al., 1998; Brooks et al., 1999; Yokoyama et al., 2000; Celerier et al., 2002]. Da in der frühen Phase der Embryonalentwicklung noch kein ausgebildetes Immunsystem vorhanden ist, bietet dieses Modell den Vorteil, dass es hierbei zu keiner Abstoßungsreaktion kommt. Daneben zeichnet sich das Modell durch einfache Präparation und geringe Kosten aus. Allerdings kann der Prozess der Angiogenese hiermit nur über einen kurzen Zeitraum von maximal 10 Tagen untersucht werden. Des Weiteren muss bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden, dass es sich bei diesem Modell um embryonales Gewebe handelt, das sich bezüglich seines Wachstumsfaktorprofils gegebenenfalls stark von adultem Gewebe unterscheidet.

Das in der vorliegenden Studie erstmals vorgestellte Modell zur Analyse der Angiogenese in Endometrioseherden in der Rückenhautkammer bietet gegenüber den herkömmlichen Modellen einige wesentliche Vorteile. So ist es möglich, die Entwicklung neuer Blutgefäße in Endometrioseherden repetitiv *in vivo* mit Hilfe der Technik der intravitralen Fluoreszenzmikroskopie detailliert zu visualisieren und anschließend computer-assistiert zu analysieren. Dabei ist sowohl die Quantifizierung von morphologischen (revaskularisierte Fläche, funktionelle Kapillardichte) als auch mikrohämodynamischen Parametern (Gefäßdurchmesser, Blutzellgeschwindigkeit, Blutfluss) in der Mikrozirkulation von Endometrioseherden möglich. Zusätzlich können auch zelluläre Prozesse, wie die Interaktion von Leukozyten mit dem Gefäßendothel, untersucht werden [Laschke et al., 2005].

7.1.2. Diskussion der Untersuchungstechniken

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie kombiniert mit der Epi-Illuminationstechnik ermöglicht eine direkte Visualisierung der Mikrozirkulation. Gerade für dynamische Prozesse, wie die Entwicklung neuer Blutgefäße, stellt sie eine ideale Untersuchungstechnik dar [Leunig et al., 1992, Menger et al., 1994; Vajkoczy et al., 2000]. Andere Verfahren wie die Mikrosphären-Technik [Zwissler et al., 1991], die Partialdruckmessung des Gewebesauerstoffs [Conzen et al., 1988, 1991], die Xenon-Clearance-Technik [Hendel, 1983], die photoelektrische Plethysmographie [Webster und Patterson, 1976], die Thermographie [Saumet et al., 1986], die Laser-Doppler-Flowmetrie [Chávez-Cartaya et al., 1995], Farbstofftechniken [Silverman et al., 1972] oder Techniken zur Anfertigung von Mikrokorrosionspräparaten [Forsman and McCormack, 1992] lassen nur indirekte Aussagen über die Mikrozirkulation zu und wären daher für die vorliegende Studie ungeeignet gewesen.

Bei der intravitralen Fluoreszenzmikroskopie besteht durch den Einsatz geeigneter Fluoreszenzfarbstoffe die Möglichkeit, das Fließverhalten einzelner Blutbestandteile, wie Leukozyten und Blutplättchen, zu untersuchen [Menger et al., 1992; Hoffmann et al., 1999, 2000]. Daneben können Zellschäden, wie Apoptose und Nekrose, visualisiert [Westermann et al., 1999; Harris et al., 1997] und Veränderungen der Gefäßpermeabilität [Pries, 1988] analysiert werden. Mit Hilfe entsprechender Bildverarbeitungstechniken können die aufgezeichneten Bilder am Ende des Versuchs, d.h. ohne weitere Beeinflussung des Versuchstieres, quantitativ ausgewertet werden [Intaglietta und Tompkins, 1972; Pries, 1988; Klyszcz et al, 1997].

Bei der intravitralen Fluoreszenzmikroskopie ist darauf zu achten, dass die Versuchszeit so kurz wie möglich gehalten wird, da phototoxische Effekte auf das untersuchende Gewebe bei dieser Technik möglich sind. Diese entstehen in der Hauptsache in Kombination

mit Fluoreszenz-Kontrastmittel als phototoxische Effekte durch die Bildung freier Sauerstoffradikale [Povlishock et al., 1983; Penning und Dubbelman, 1994]. Im Bereich der Mikrozirkulation kann dies zu Blutplättchenaktivierung mit Thrombusbildung [Rosenblum, 1978; Herrmann, 1983], Endothelzellschäden mit Erhöhung der Gefäßwandpermeabilität [Povlishock et al., 1983; Reed und Miller, 1988], Vasospasmus [Saetzler et al., 1997], Reduktion der funktionellen Kapillardichte [Friesenecker et al., 1994] oder vermehrter Leukozyten-Endothelzell-Interaktion [Gawlowski et al., 1989; Saetzler et al., 1997] führen. In der vorliegenden Studie wurden daher die nach Steinbauer et al. [2000] geforderten Untersuchungsbedingungen eingehalten (max. Beobachtungszeit 20-30min., übliche Dosierung für Rhodamin-6G und FITC-Dextran), um die beschriebenen phototoxischen Effekte zu vermeiden.

7.2. Diskussion der Ergebnisse

7.2.1. Bedeutung von Hormonstatus und Endometrium-Fragmentgröße

Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit konnte ein neues Modell zur Untersuchung der Entwicklung neuer Blutgefäße in Endometrioseherden entwickelt werden, mit dem es erstmals möglich ist, die einzelnen Stadien der Angiogenese mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie schrittweise *in vivo* darzustellen. Dabei zeigte sich, dass die neu gebildeten Blutgefäße in großen Endometrioseherden eine höhere Blutzellgeschwindigkeit und mikrovaskulären Blutfluss aufweisen als die Gefäße in kleineren Herden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Ovariectomie der Versuchstiere zu einer verzögerten Vaskularisierung und reduzierten Perfusion der Endometrioseherde führte.

Es ist bekannt, dass eine Endometriose nur in Organismen spontan entstehen kann, bei denen eine Menstruationsblutung stattfindet, d.h. in Primaten und Menschen. Unsere histologischen Ergebnisse stimmen jedoch mit früheren Studien überein, die bereits zeigen konnten, dass isolierte Endometrium-Fragmente Endometriose-ähnliche Läsionen ausbilden, wenn sie heterotop transplantiert werden [Maas et al., 2001; Nap et al., 2003 und 2004; Drenkhahn et al., 2004; Awwad et al., 1999; Somigliana et al., 1999; Zamah et al., 1984; Brunner et al., 1997].

Bezüglich der Kapillardichte wiesen die analysierten Herde in der Gruppe der unbehandelten Tiere im Beobachtungszeitraum von 14 Tagen deutliche Schwankungen auf, die jedoch nicht signifikant waren. Diese Beobachtung könnte einerseits durch die physiologische Variabilität oder andererseits durch den viertägigen Menstruationszyklus der Versuchstiere bedingt sein. So muss davon ausgegangen werden, dass sich nicht alle Tiere dieser Gruppe im gleichen Zyklusstadium befanden. Für diese Interpretation der Ergebnisse

spricht auch die Tatsache, dass die Schwankungen der Kapillardichte in der Gruppe der hormonell synchronisierten geringer waren. Dies zeigt, dass es wichtig ist, bei Untersuchungen im vorliegenden Modell die Tiere zunächst zu synchronisieren.

Zamah et al. [1984] und Aoki et al. [1994] fanden in ihren Untersuchungen keinen Zusammenhang zwischen der Ausbildung von Endometrioseherden und dem Vorhandensein von weiblichen Sexualhormonen. In unserer Studie konnten jedoch deutliche Unterschiede zwischen den unbehandelten und synchronisierten Tieren einerseits und den ovariectomierten Tieren andererseits festgestellt werden. So konnte durch die Ovariectomie der Tiere in den ersten Tagen nach der Implantation der Endometrioseherde eine deutlich verzögerte Vaskularisierung und reduzierte funktionelle Kapillardichte beobachtet werden. Dies ist wahrscheinlich auf den Östrogenmangel der Tiere infolge der Ovariectomie zurückzuführen. In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass Östrogen die Angiogenese dadurch stimulieren kann, dass es die VEGF mRNA Expression hochreguliert [Shifren et al., 1996; Huang et al., 1998; Cullinan-Bove et al., 1993; Hyder et al., 1996]. Unsere *in vivo* Ergebnisse zeigen nun deutlich, dass die ovariellen Steroidhormone entscheidend bei der Blutgefäßneubildung in Endometrioseherden beteiligt sind. Diese Schlussfolgerung wird auch durch die Beobachtung gestützt, dass durch die Gabe von GnRH Analoga die Vaskularisierung von Endometrioseherden reduziert wird [Ryan et al., 1997].

Neben einer hormonellen Regulation ist auch hypoxischer Stress im vorliegenden Modell als wichtiger angiogener Stimulus zu berücksichtigen. So wurden die isolierten Endometrium-Fragmente aller Gruppen frei in die Rückenhautkammer transplantiert. Entsprechend wiesen die Transplantate in den ersten Tagen nach Transplantation noch keine eigene Blutversorgung auf und waren daher hypoxischem Stress ausgesetzt. Es ist bekannt, dass Hypoxie die Angiogenese durch vermehrte VEGF-Bildung induzieren kann [Sheweiki et al., 1992]. Daher war es in der vorliegenden Studie zu erwarten, dass auch die Endometrioseherde in den ovariectomierten Tieren im Beobachtungszeitraum von 14 Tagen vaskularisierten. Die starke Zunahme der Vaskularisierung dieser Herde zwischen Tag 2 und 4 kann dadurch erklärt werden, dass die Herde im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen bis zum 2. Tag wesentlich mehr Hypoxie ausgesetzt waren, weil sie eine geringere vaskularisierte Fläche und Kapillardichte aufwiesen. Hypoxie-induzierte VEGF-Freisetzung spielt daher im vorliegenden Modell wahrscheinlich eine wesentliche Rolle. Östrogen hat dabei eine additive Wirkung auf die Vaskularisierung der Endometrioseherde, indem es den Vaskularisierungsprozess noch beschleunigt.

Im Vergleich zu den unbehandelten und synchronisierten Tieren waren die Blutzellgeschwindigkeit und der mikrovaskuläre Blutfluss in den Endometrioseherden der ovariecto-

mierten Tiere signifikant reduziert. Dies ist am ehesten auf eine reduzierte zelluläre Aktivität aufgrund des Östrogenmangels zurückzuführen, was einen niedrigeren Sauerstoff- und Nährstoffbedarf dieser Herde zur Folge hat. Entsprechend dieser Interpretation wiesen die großen Herde, die durch ihre Gewebemasse einen höheren metabolischen Bedarf haben, im Vergleich zu den kleinen Herden eine erhöhte mikrovaskuläre Perfusion auf.

Da auch die Aktivierung des Immunsystems bei der Angiogenese von Endometrioseherden eine Rolle spielen könnte [Kyama et al.; 2003], wurde im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in den Endometrioseherden analysiert. Dabei zeigte sich jedoch in allen Gruppen, dass es in den neu gebildeten Gefäßnetzwerken der Endometrioseherde nicht zu einer vermehrten Leukozytenakkumulation kam. Daher kann man in diesem Modell die Freisetzung von angiogenen Faktoren aus Leukozyten als wichtigen Stimulus für die Angiogenese ausschließen.

7.2.2. Bedeutung der pro-angiogenen Faktoren VEGF, FGF und PDGF

In diesem Studienabschnitt wurde nachgewiesen, dass die kombinierte Blockade der pro-angiogenen Faktoren VEGF, FGF und PDGF zu einer deutlichen Reduktion der Vaskularisierung und Größe von Endometrioseherden führt. Für diese Untersuchungen wurden die zwei Tyrosinkinase-Inhibitoren SU5416 und SU6668 eingesetzt, die in früheren Studien bereits die Angiogenese und das Wachstum von Tumoren nachweislich hemmten [Vajkoczy et al., 1999; Laird et al., 2000; Ning et al., 2002; Bergers et al., 2003]. Die Vorteile beider Inhibitoren liegen in ihrer lipophilen Struktur und dem niedrigen Molekulargewicht, so dass sie schnell das Gefäßendothel durchdringen und an die intrazellulären Domänen der Tyrosinkinase-Rezeptoren binden können [Fong et al., 1999]. Dabei wurden für diese Arbeit Dosierungen von SU5416 (25mg/kg) und SU6668 (75mg/kg) eingesetzt, für die bereits in früheren Studien eine gute Wirkung ohne Toxizität nachgewiesen werden konnte [Fong et al., 1999; Ning et al., 2002].

Die Behandlung der Versuchstiere mit SU6668 führte zu einer signifikanten Reduktion der Größe und Dichte neugebildeter Gefäßnetzwerke innerhalb der Endometrioseherde. Dabei ist zu beachten, dass SU6668 ein Angiogenese-Inhibitor ist, der im Gegensatz zu SU5416 nicht nur den VEGF Rezeptor VEGFR-2 auf Endothelzellen blockiert, sondern auch auf die Rezeptoren FGFR-1 und PDGFR- β auf Stromazellen und Perizyten wirkt. Daher zeigen unsere Ergebnisse, dass erst durch eine Hemmung der Interaktion zwischen Endothel und perivaskulären Zellen die Vaskularisierung in ektopem Endometriumgewebe effektiv reduziert werden kann [Laschke et al., 2006a].

Ein wichtiger Schritt bei der Angiogenese ist die Ausreifung neugebildeter Kapillaren, die durch Anlagerung von stabilisierenden Perizyten an die Gefäßwand gekennzeichnet ist. Bei diesem Vorgang ist insbesondere der pro-angiogene Faktor PDGF beteiligt [Sato et al., 1993; Lindahl et al., 1997]. Die Inhibition von PDGF kann daher zu Perizytenmangel und infolgedessen zur Instabilität der Gefäßwand führen [Hellström et al., 2001; Papetti und Herman, 2002]. Übereinstimmend konnte in der vorliegenden Arbeit durch immunhistochemische Färbung von Desmin nachgewiesen werden, dass in den Endometrioseherden der SU6668-behandelten Tiere keine Perizyten an den neugebildeten Gefäßen angelagert waren. Dies führte zu unreifen, massiv dilatierten Gefäßen mit unregelmäßiger Wandstruktur in der intravitalmikroskopischen Darstellung. Im Gegensatz dazu wiesen die Kontrollgruppe und die SU5416-behandelten Tiere homogene Gefäßdurchmesser auf. Sie reduzierten sich im Rahmen des angiogenen Prozesses während des Beobachtungszeitraumes auf 11µm, was indirekt ein Nachweis für die Reifung der Gefäße darstellt.

In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass die alleinige Inhibition von VEGF zu einer deutlichen Größenreduktion von Endometrioseherden führte [Hull et al., 2003]. Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Studie nicht reproduziert werden. Durch die Hemmung von VEGF kam es zwar zu einer signifikanten Abnahme der Gefäßdichte, die Größe der revaskularisierten Fläche zeigte jedoch in den SU5416-Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe interessanterweise keine signifikanten Unterschiede. Auch die Herdgröße war in der SU5416- und in der Kontrollgruppe identisch. Dies bestätigt die Tatsache, dass in der Pathogenese der Endometriose noch weitere pro-angiogene Faktoren eine wichtige Rolle spielen müssen [Huang und Yeh, 1994; Fujimoto et al., 1999; Piva und Sharpe-Timms, 1999; Ryan et al., 1995], die in dieser Studie die Inhibition von VEGF kompensieren konnten.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieses Studienabschnitts, dass die kombinierte Blockade der angiogenen Faktoren VEGF, PDGF und FGF wesentlich besser die Vaskularisierung von Endometrioseherden hemmt als die einfache Inhibition von VEGF. Daher könnte die kombinierte Gabe von anti-angiogenen Substanzen, die zeitgleich auf unterschiedliche Mechanismen der Angiogenese einwirken, eine effektive neue Therapiestrategie in der Behandlung der Endometriose darstellen.

7.2.3. Einfluss des selektiven Cyclooxygenase-2-Inhibitors NS398

In diesem Studienabschnitt konnte nachgewiesen werden, dass durch eine selektive Cyclooxygenase-2-Inhibition die Größe und die funktionelle Kapillardichte von Endometrioseherden deutlich reduziert werden kann. Die Cyclooxygenase spielt bei der Prostaglandinsynthese eine wichtige Rolle. Seit 1972 ist bekannt, dass es 2 Formen der Cyclooxygenase, COX-1

und COX-2, gibt [Smith and Lands, 1972; Lysz et al., 1982 und 1988; Simmons et al., 2004]. Zu Beginn der Neunziger Jahre des letzten Jahrhunderts wurde die kristalline Struktur beider Cyclooxygenasen aufgedeckt. Beide unterscheiden sich durch eine unterschiedliche Größe und Lokalisation im Organismus. Im Gegensatz zur COX-1 findet man die COX-2 vorwiegend in den Endothelzellen proliferierender und arteriosklerotischer Gefäße sowie in entzündetem Gewebe und Tumorgewebe [Sano et al., 1992; Schonbeck et al., 1999; Simmons et al., 2004].

Aus früheren Studien ist bekannt, dass auch in Endometrioseherden vermehrt COX-2 hochreguliert ist [Deguchi et al., 2001; Ota et al., 2001; Chishima et al., 2002]. Daneben konnte in Tumorstudien gezeigt werden, dass durch COX-2-Inhibition die Angiogenese gehemmt werden kann [Williams et al., 2000]. Dabei werden generell zwei mögliche Mechanismen diskutiert. So führt die Hemmung von COX-2 einerseits zu einer verminderten Ausschüttung von pro-angiogenen Wachstumsfaktoren wie VEGF [Williams et al., 2000]. Andererseits wäre es möglich, dass eine COX-2-Inhibition zur Ausbildung von Mikrothrombosen führt [Mukherjee et al., 2001]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl am Tag 2 als auch am Tag 14 nach Transplantation von Endometrium-Fragmenten in die Rückenhautkammer durch COX-2-Inhibition die VEGF-Expression in den Herden signifikant reduziert wurde, was am ehesten die verminderte Kapillardichte der Herde zwischen Tag 7 und 14 erklären könnte. Im Gegensatz hierzu konnten in den histologischen Präparaten keine Mikrothrombosen in den neu gebildeten Gefäßen der Herde nachgewiesen werden. Daher kann dieser Mechanismus als Erklärung für die schlechtere Vaskularisierung der Endometrioseherde in der NS398-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ausgeschlossen werden [Laschke et al., 2007]

Daneben zeigte die Western Blot Analyse der Herde in der NS398-Gruppe am 2. Tag eine reduzierte PCNA Expression und erhöhte Expression der aktivierten Caspase-3. Diese Ergebnisse zeigen, dass durch eine Inhibition von COX-2 die Zellproliferation gehemmt und gleichzeitig die Apoptose verstärkt wird. Ähnliche Ergebnisse konnten bereits im Tumormodell beobachtet werden [Samaha et al., 1997; Tsujii et al., 1995; DuBois et al., 1996]. Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nur am 2. Beobachtungstag ein deutlicher Anstieg der Apoptose nachgewiesen werden. Am Tag 14 waren die Ergebnisse dagegen mit der Kontrollgruppe vergleichbar. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass insbesondere in den ersten Tagen nach Transplantation der Endometrium-Fragmente in die Rückenhautkammer Apoptose stattfand, weil zu diesem Zeitpunkt die Transplantate vermehrter Hypoxie ausgesetzt waren.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Inhibition der COX-2 einen vielversprechenden Ansatz in der Behandlung der Endometriose darstellt. Dabei könnten die Patientinnen sowohl von der anti-proliferativen und anti-angiogenen Wirkung eines COX-2-Inhibitors profitieren als auch von dessen analgetischer Wirkung. Ein weiterer wichtiger Vorteil von COX-2-Inhibitoren gegenüber der konventionellen medikamentösen Endometriose-Therapie wäre, dass hierbei nicht in den Hormonhaushalt der Patientinnen mit all den assoziierten Nebenwirkungen eingegriffen werden müsste.

7.2.4. Einfluss des Immunsuppressivums Rapamycin

Rapamycin (Sirolimus) wurde vor 25 Jahren in einer Bodenprobe der Osterinsel „Rapa Nui“ entdeckt [Morris, 1992]. Es gehört zur Gruppe der Makrolidantibiotika, welches aus dem Bakterium *Streptomyces hygroscopicus* gewonnen wird. Rapamycin ist ein 31-gliedriges Makrolid und gehört zu einer neuen Klasse therapeutischer Agentien mit immunsuppressiven und anti-kanzerogenen Eigenschaften [Kirken und Wang, 2003; Guba et al., 2002, 2005b; Yakupoglu und Kahan, 2003]. Rapamycin wird derzeit hauptsächlich zur Verhinderung der Organabstoßung nach einer Nieren-, Leber- und Herztransplantation in Kombination mit Corticosteroiden und Cyclosporin eingesetzt [Camardo, 2003].

Rapamycin wirkt über eine Komplexbildung mit dem mTOR-Protein („mammalian Target of Rapamycin“); [Abraham und Wiederrecht, 1996], einer 282kDa großen Phosphoinositid-3-Kinase. Dies hemmt die nachfolgende Aktivierung und anschließende Proteinsynthese der S6-Kinase. Die Aktivierung des ribosomalen Protein S6 unterbleibt dadurch. Durch die Hemmung von mTOR wird die Aktivierung der p34cdc2 Kinase gehemmt und die Komplexbildung mit Cyclin E unterbleibt. Als Folge können die T-Zellen nicht von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzykluses übergehen [Sigal und Dumont, 1992]. Weiterhin kann durch die Blockade des mTor-Proteins Interleukin-2 nicht an seinen Rezeptor binden, was eine Hemmung der Lymphozytenaktivierung zur Folge hat.

In diesem Studienabschnitt wurde die Wirkung von Rapamycin auf Endometrioseherde analysiert. Aus anderen Studien, die in Tumoren durchgeführt wurden, ist bekannt, dass Rapamycin die VEGF Produktion und damit die Angiogenese hemmt [Guba et al., 2002]. Diesen Effekt untersuchten wir *in vivo* in den Endometrium-Fragmenten, welche in die Rückenhautkammer transplantiert wurden. Dabei zeigte sich auch im Falle der Endometrioseherde die anti-angiogene Wirkung des Rapamycins, was zu einer signifikant reduzierten Netzwerkfläche und funktionellen Kapillardichte in den Endometrium-Transplantaten nach 14 Tagen Beobachtungszeit führte. Des Weiteren konnte die anti-angiogene Wirkung in der vorliegenden Arbeit auch *in vitro* mit Hilfe des Aorten-Ring-Assays nachgewiesen werden [Laschke et al., 2006b].

Neben einer verminderten VEGF Expression konnte Guba et al. [2005b] im Tumormodell auch zeigen, dass die Behandlung mit Rapamycin zu einer vermehrten Mikrothrombosierung von neugebildeten Tumorgefäßen führte. Dieses Ergebnis konnte im Falle der hier untersuchten Endometrioseherde nicht beobachtet werden. So zeigte die histologische Analyse der Herde in Rapamycin-behandelten Tieren, dass die neugebildeten Blutgefäße alle mit Erythrozyten perfundiert waren ohne Anzeichen auf Plättchen- und Fibrinablagerungen in den Gefäßlumina. Daher ist davon auszugehen, dass die beobachtete anti-angiogene Wirkung des Rapamycins auf Endometrioseherde hauptsächlich durch eine verminderte Freisetzung von VEGF vermittelt wird. Da jedoch neben VEGF noch andere pro-angiogene Wachstumsfaktoren in der Pathogenese der Endometriose beteiligt sind [Taylor et al., 2002], konnte in der vorliegenden Arbeit die Vaskularisierung der Herde durch Rapamycin-Behandlung nicht vollständig gehemmt werden.

Interessanterweise wurden während des 14-tägigen Beobachtungszeitraumes in den Endometrioseherden der Rapamycin-Gruppe vergrößerte Kapillardurchmesser im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt. Dies könnte einerseits durch eine mangelnde Ausreifung der Gefäße verursacht werden. So kommt es normalerweise im Rahmen der Angiogenese zu einer Abnahme der Durchmesser neugebildeter Gefäße im Zeitverlauf, da sich wandstabilisierende Perizyten an die Gefäße anlagern [Rissau, 1997; Carmeliet, 2000; Laschke et al., 2002]. Falls dieser Prozess gestört ist, führt dies jedoch zu Wandunregelmäßigkeiten in den Gefäßen, was in einer großen Heterogenität der Gefäßdurchmesser zum Ausdruck kommt (siehe auch Abschnitt 7.2.2.). Diese Beobachtung konnte jedoch im Falle der Rapamycin-behandelten Gruppe nicht gemacht werden. Daher scheint die beobachtete Vasodilatation eher ein adaptiver Mechanismus zu sein, der wie bereits im Tumormodell beschrieben [Ryschisch et al., 2004] dazu führt, dass die endotheliale Austauschfläche für Sauerstoff und Nährstoffe in den Endometrioseherden zunimmt und so die verschlechterte Vaskularisierung teilweise kompensiert wird. Entsprechend wiesen die Gefäße in den Endometrioseherden der Rapamycin-Gruppe am Tag 14 im Vergleich zur Kontrolle auch einen erhöhten Blutfluss auf. Dieser Effekt ist nicht spezifisch für Endometrioseherde anzusehen, da er auch bei Tumoren beobachtet wird, die mit anti-angiogenen Substanzen behandelt werden [Vajkoczy et al., 1999].

Neben der anti-angiogenen Wirkung des Rapamycins konnte in der vorliegende Studie anhand von Western Blot Analysen gezeigt werden, dass eine Rapamycin-Behandlung auch die Zellproliferation in Endometrioseherden hemmt. Dabei zeigte die immunhistochemische Färbung der Endometrioseherde, dass dies hauptsächlich für stromale und endotheliale Zellen gilt. Dies ist ein überraschendes Ergebnis, da in früheren Studien eine anti-proliferative

Wirkung des Rapamycins erst bei sehr hohen Dosen ($100\text{-}400\text{mg/kg}^{-1}/\text{Tag i.p.}$) beschrieben wurde [Wiederrecht et al., 1995; Eng et al., 1984]. In der vorliegenden Arbeit wurde dagegen eine relativ niedrige Dosis von $1,5\text{mg/kg KG}$ verwendet, für die bereits in Tumorstudien eine optimale anti-angiogene Wirkung gezeigt werden konnte [Guba et al., 2005a]. Des Weiteren berichtete Stephan et al. [2004] in einer Studie, dass Rapamycin in Pankreas-Tumorzellen vermehrt Apoptose induzierte. Dies wurde jedoch im Falle der hier untersuchten Endometrioseherde nicht gezeigt. Aufgrund der diskrepanten Ergebnisse zu früheren Studien kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die Wirkung von Rapamycin auf Zellproliferation und Apoptose insbesondere auch vom untersuchten Gewebetyp abhängig ist. In diesem Falle könnte Rapamycin möglicherweise als ein selektives anti-angiogenes Medikament eingesetzt werden, sowohl für die Behandlung von Tumoren als auch von Endometrioseherden.

7.2.5. Schlussfolgerung und klinische Perspektiven

Im Rahmen der vorliegenden experimentellen Arbeit konnte ein neues Modell zur Untersuchung der Angiogenese in Endometrioseherden etabliert werden. Mit diesem *in vivo* Modell ist es erstmalig möglich, sämtliche Schritte der Angiogenese in Endometrioseherden mittels der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie repetitiv zu analysieren. Dabei können sowohl morphologische und hämodynamische als auch zelluläre Aspekte systematisch untersucht werden.

Aus den gewonnenen Erkenntnissen dieser Arbeit geht hervor, dass mit diesem Modell einerseits die Einflüsse des Hormonsystems und andererseits die Bedeutung verschiedener pro-angiogener Wachstumsfaktoren in der Pathogenese der Endometriose untersucht werden können. Des Weiteren eignet sich dieses Modell hervorragend dazu, die anti-angiogene Wirkung verschiedener Medikamente, die bereits im klinischen Einsatz sind (wie z.B. Cyclooxygenase-2-Inhibitoren oder Rapamycin), auf die Entwicklung von Endometrioseherden zu analysieren. Daher könnte dieses neue Endometriose-Modell zukünftig einen wichtigen Beitrag dazu leisten, um neue anti-angiogene Therapiestrategien in der Behandlung der Endometriose zu entwickeln, die sich im klinischen Einsatz möglicherweise durch geringere Nebenwirkungen und höhere Effektivität im Vergleich zu den konventionellen Behandlungsmethoden auszeichnen.

8. Literaturverzeichnis

1. **Abraham RT, Wiederrecht GJ.** Immunopharmacology of rapamycin. *Annu Rev Immunol* 1996; 14:483-510.
2. **Algire GH.** An adaption of the transparent-chamber technique to the mouse. *J Natl Cancer Inst* 1943; 1-11.
3. **Aoki D, Katsuki Y, Shimizu A, Kakinuma C, Nozawa S.** Successful heterotransplantation of human endometrium in SCID mice. *Obstet Gynecol* 1994; 83:220-8.
4. **Asaishi K, Endrich B, Götz A, Messmer K.** Quantitative analysis of microvascular structure and function in the amelanotic melanoma A-Mel-3. *Cancer Res* 1981; 41:1898-904.
5. **Augustin HG, Braun K, Telemenakis I, Modlich U, Kuhn W.** Ovarian angiogenesis. Phenotypic characterization of endothelial cells in a physiological model of blood vessel growth and regression. *Am J Pathol* 1995; 147:339-51.
6. **Awwad JT, Sayegh RA, Tao XJ, Hassan T, Awwad ST, Isaacson K.** The SCID mouse: an experimental model for endometriosis. *Hum Reprod* 1999; 14:3107-11.
7. **Baker M, Wayland H.** Online volume flow rate and velocity profile measurement for blood in microvessels. *Microvasc Res* 1974; 7:131-43.
8. **Banda MJ, Knighton DR, Hunt TK, Werb Z.** Isolation of a nonmitogenic angiogenesis factor from wound fluid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79:7773-7.
9. **Becker CM, Bartley J, Mechsner S, Ebert AD.** Angiogenesis and endometriosis. *Zentralbl Gynakol* 2004; 126:252-8.
10. **Becker CM, Sampson DA, Rupnick MA, Rohan RM, Efstathiou JA, Short SM, Taylor GA, Folkman J, D'Amato RJ.** Endostatin inhibits the growth of endometriotic lesions but does not affect fertility. *Fertil Steril* 2005; 84 Suppl 2:1144-1155.
11. **Becker CM, Wright RD, Satchi-Fainaro R, Funakoshi T, Folkman J, Kung AL, D'Amato RJ.** A novel noninvasive model of endometriosis for monitoring the efficacy of antiangiogenic therapy. *Am J Pathol* 2006; 168:2074-84.
12. **Benjamin LE, Hemo I, Keshet E.** A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* 1998; 125:1591-8.
13. **Bergers G, Song S, Meyer-Morse N, Bergsland E, Hanahan D.** Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest* 2003; 111:1287-95.
14. **Bicknell R, Harris AL.** Novel angiogenic signaling pathways and vascular targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44:219-38.

15. **Brooks PC, Montgomery AM, Cheresh DA.** Use of the 10-day-old chick embryo model for studying angiogenesis. *Methods Mol Biol* 1999; 129:257-69.
16. **Bruner KL, Matrisian LM, Rodgers WH, Gorstein F, Osteen KG.** Suppression of matrix metalloproteinases inhibits establishment of ectopic lesions by human endometrium in nude mice. *J Clin Invest* 1997; 99:2851-7.
17. **Bruns CJ, Koehl GE, Guba M, Yezhelyev M, Steinbauer M, Seeliger H, Schwend A, Hoehn A, Jauch KW, Geissler EK.** Rapamycin-induced endothelial cell death and tumor vessel thrombosis potentiate cytotoxic therapy against pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10:2109-19.
18. **Burnette WN.** "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 1981; 112:195-203.
19. **Burton KS, Johnson PC.** Reactive hyperemia in individual capillaries of skeletal muscle. *Am J Physiol* 1972; 223:517-24.
20. **Camardo J.** The Rapamune era of immunosuppression 2003: the journey from the laboratory to clinical transplantation. *Transplant Proc* 2003; 35:18S-24S.
21. **Carmeliet P.** Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; 6:389-95.
22. **C  lerier J, Cruz A, Lamand   N, Gasc JM, Corvol P.** Angiotensinogen and its cleaved derivatives inhibit angiogenesis. *Hypertension* 2002; 39:224-8.
23. **Ch  vez-Cartaya RE, Ramirez P, Jamieson NV.** Haemoglobin saturation in the rat liver after ischaemia and reperfusion: study using a laser photometry technique and correlation with changes in liver tissue blood flow. *Eur Surg Res* 1995; 27:82-92.
24. **Chishima F, Hayakawa S, Sugita K, Kinukawa N, Aleemuzzaman S, Nemoto N, Yamamoto T, Honda M.** Increased expression of cyclooxygenase-2 in local lesions of endometriosis patients. *Am J Reprod Immunol* 2002; 48:50-6.
25. **Conzen PF, Hobbhahn J, Goetz AE, Habazettl H, Granetzny T, Peter K, Brendel W.** Splanchnic oxygen consumption and hepatic surface oxygen tensions during isoflurane anesthesia. *Anesthesiology* 1988; 69:643-51.
26. **Conzen PF, Habazettl H, Christ M, Baier H, Hobbhahn J, Vollmar B, Peter K.** Left ventricular surface tissue oxygen pressures determined by oxygen sensitive multiwire electrodes in pigs. *Cardiovasc Res* 1991; 25:207-16.
27. **Costa M, Danesi R, Agen C, Di Paolo A, Basolo F, Del Bianchi S, Del Tacca M.** MCF-10A cells infected with the int-2 oncogene induce angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane and in the rat mesentery. *Cancer Res* 1994; 54:9-11.
28. **Cullinan-Bove K, Koos RD.** Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in the rat uterus: rapid stimulation by estrogen correlates with estrogen-induced increases in uterine capillary permeability and growth. *Endocrinology* 1993; 133:829-37.

29. **Deguchi M, Ishiko O, Sumi T, Yoshida H, Yamamoto K, Ogita S.** Expression of angiogenic factors in extrapelvic endometriosis. *Oncol Rep* 2001; 8:1317-9.
30. **Dogan E, Saygili U, Posaci C, Tuna B, Caliskan S, Altunyurt S, Saatli B.** Regression of endometrial explants in rats treated with the cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib. *Fertil Steril* 2004; 82 Suppl 3:1115-1120.
31. **Donnez J, Smoes P, Gillerot S, Casanas-Roux F, Nisolle M.** Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *Hum Reprod* 1998; 13:1686-90.
32. **Drenkhahn M, Gescher DM, Wolber EM, Meyhoefer-Malik A, Malik E.** Expression of angiopoietin 1 and 2 in ectopic endometrium on the chicken chorioallantoic membrane. *Fertil Steril* 2004; 1:869-75.
33. **DuBois RN, Shao J, Tsujii M, Sheng H, Beauchamp RD.** G1 delay in cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase-2. *Cancer Res* 1996; 56:733-7.
34. **Duling BR.** The preparation and use of the hamster cheek pouch for studies of the microcirculation. *Microvasc Res* 1973; 5:423-9.
35. **Eggermont J, Donnez J, Casanas-Roux F, Scholtes H, Van Langendonck A.** Time course of pelvic endometriotic lesion revascularization in a nude mouse model. *Fertil Steril* 2005; 84:492-9.
36. **Endrich B, Asaishi K, Götz A, Messmer K.** Technical report: a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med* 1980; 177:125-34.
37. **Endrich B, Hammersen F, Götz A, Messmer K.** Microcirculatory blood flow, capillary morphology and local oxygen pressure of the hamster amelanotic melanoma A-Mel-3. *J Natl Cancer Inst* 1982; 68:475-85.
38. **Eng CP, Sehgal SN, Vezina C.** Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors. *J Antibiot* 1984; 37:1231-7.
39. **Ferriani RA, Charnock-Jones DS, Prentice A, Thomas EJ, Smith SK.** Immunohistochemical localization of acidic and basic fibroblast growth factors in normal human endometrium and endometriosis and the detection of their mRNA by polymerase chain reaction. *Hum Reprod* 1993; 8:11-6.
40. **Fiebig E, Ley K, Arfors KE.** Rapid leukocyte accumulation by "spontaneous" rolling and adhesion in the exteriorized rabbit mesentery. *Int J Microcirc Clin Exp* 1991; 10:127-44.
41. **Folkman J.** Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* 1985; 43:175-203.
42. **Folkman J.** Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1:27-31.

43. **Fong TA, Shawver LK, Sun L, Tang C, App H, Powell TJ, Kim YH, Schreck R, Wang X, Risau W, Ullrich A, Hirth KP, McMahon G.** SU5416 is a potent and selective inhibitor of thvascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res* 1999; 59:99-106.
44. **Forsman AD, McCormack JT.** Microcorrosion casts of hamster luteal and follicular vasculature throughout the estrous cycle. *Anat Rec* 1992; 233:515-20.
45. **Friesenecker B, Tsai AG, Instaglietta M.** Capillary perfusion during ischemia-reperfusion in subcutaneous connective tissue and skin muscle. *Am J Physiol* 1994; 267:H2204-12.
46. **Fujimoto J, Sakaguchi H, Hirose R, Tamaya T.** Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) related to angiogenesis in ovarian endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:359-62.
47. **Funk W, Endrich B, Messmer K.** A novel method for follow-up studies of the microcirculation in non-malignant tissue implants. *Res Exp Med* 1986; 186:259-70.
48. **Galle PC.** Clinical presentation and diagnosis of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1989; 16:29-42.
49. **Gawlowski DM, Harding NR, Granger HJ.** Leukocyte phagocytosis and alterations in microvascular integrity elicited by FITC-dextran 150 and epi-illumination in the microcirculation of the hamster cheek pouch. *Microvasc Res* 1989; 37:1-15.
50. **Greenblatt M, Shubik P.** Tumor angiogenesis: transfilter diffusions studies in the hamster by the transparent chamber technique. *J Natl Cancer Inst* 1968; 41:111-24.
51. **Greenburg GB, Hunt TK.** The proliferative response in vitro of vascular endothelial and smooth muscle cells exposed to wound fluids and macrophages. *J Cell Physiol* 1978; 97:353-60.
52. **Grio R, Geranio R, Porpiglia M, Leidi L, Piacentino R.** Use of a GnRH analogue (leuprorelin) in the therapy of endometriosis. *Minerva Ginecol* 1997; 49:417-9.
53. **Gross GH.** A technique for sustained synchronization of hamster estrous cycles by hormonal means. *Horm Behav* 1977; 9:23-31.
54. **Grümmer R, Schwarzer F, Balczyk K, Hess-Stumpp H, Regidor PA, Schindler AE, Winterhager E.** Peritoneal endometriosis: validation of an in vivo model. *Hum Reprod* 2001; 16:1736-43.
55. **Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, Bruns CJ, Zuelke C, Farkas S, Anthuber M, Jauch KW, Geissler EK.** Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 2002; 8:128-35.
56. **Guba M, Koehl GE, Neppl E, Doenecke A, Steinbauer M, Schlitt HJ, Jauch KW, Geissler EK.** Dosing of rapamycin is critical to achieve an optimal antiangiogenic effect against cancer. *Transpl Int* 2005a; 18:89-94.

57. **Guba M, Yezhelyev M, Eichhorn ME, Schmid G, Ischenko I, Papyan A, Graeb C, Seeliger H, Geissler EK, Jauch KW, Bruns CJ.** Rapamycin induces tumor-specific thrombosis via tissue factor in the presence of VEGF. *Blood* 2005b; 105:4463-9.
58. **Halban J.** Hysteroadenosis metaplastica. *Wien Klin Wochenschr* 1924; 37:1205-6.
59. **Hanahan D, Folkman J.** Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86:353-64.
60. **Harris AG, Steinbauer M, Leiderer R, Messmer K.** Role of leukocyte plugging and edema in skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1997; 273:H989-96.
61. **Hellström M, Gerhardt H, Kalen M, Li X, Eriksson U, Wolburg H and Betsholtz C.** Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol* 2001; 153:543-53.
62. **Hendel PM, Lilien DL, Buncke HJ.** A study of the pharmacologic control of blood flow to delayed skin flaps using xenon washout. Part II. *Plast Reconstr Surg* 1983; 71:399-407.
63. **Herrmann KS.** Platelet aggregation induced in the hamster cheek pouch by a photochemical process with excited fluorescein isothiocyanate-dextran. *Microvasc Res* 1983; 26:238-49.
64. **Hoekman K.** SU6668, a multitargeted angiogenesis inhibitor. *Cancer J* 2001; 7 Suppl 3:S134-8.
65. **Hoffmann JN, Vollmar B, Inthorn D, Schildberg FW, Menger MD.** A chronic model for intravital microscopic study of microcirculatory disorders and leukocyte/endothelial cell interaction during normotensive endotoxemia. *Shock* 1999; 12:355-64.
66. **Hoffmann JN, Vollmar B, Inthorn D, Schildberg FW, Menger MD.** The thrombin antagonist hirudin fails to inhibit endotoxin-induced leukocyte/endothelial cell interaction and microvascular perfusion failure. *Shock* 2000; 14:528-34.
67. **Huang JC and Yeh J.** Quantitative analysis of epidermal growth factor receptor gene expression in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79:1097-1101.
68. **Huang JC, Liu DY, Dawood MY.** The expression of vascular endothelial growth factor isoforms in cultured human endometrial stromal cells and its regulation by 17beta-oestradiol. *Mol Hum Reprod* 1998; 4:603-7.
69. **Hull ML, Charnock-Jones DS, Chan CL, Bruner-Tran KL, Osteen KG, Tom BD, Fan TP, Smith SK.** Antiangiogenic agents are effective inhibitors of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:2889-99.
70. **Hull ML, Prentice A, Wang DY, Butt RP, Phillips SC, Smith SK, Charnock-Jones DS.** Nimesulide, a COX-2 inhibitor, does not reduce lesion size or number in a nude mouse model of endometriosis. *Hum Reprod* 2005; 20:350-8.

71. **Hyder SM, Stancel GM, Chiappetta C, Murthy L, Boettger-Tong HL, Makela S.** Uterine expression of vascular endothelial growth factor is increased by estradiol and tamoxifen. *Cancer Res* 1996; 56:3954-60.
72. **Intaglietta M, Tompkins WR, Richardson DR.** Velocity measurements in the microvasculature of the cat omentum by online method. *Microvasc Res* 1970; 2:462-73.
73. **Intaglietta M, Tompkins WR.** Online measurement of microvascular dimensions by television microscopy. *J Appl Physiol* 1972; 32:546-51.
74. **Iwabe T, Harada T, Tsudo T, Tanikawa M, Onohara Y, Terakawa N.** Pathogenetic significance of increased levels of interleukin-8 in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1998; 69:924-930.
75. **Jakobsson AE, Norrby K, Ericson LE.** A morphometric method to evaluate angiogenesis kinetics in the rat mesentery. *Int J Exp Pathol* 1994; 75:219-24.
76. **Kamiński P, Grzechocińska B, Gadomska H, Barcz E, Marianowski L.** The results of GnRH analog treatment of endometriosis. *Ginekol Pol* 2001; 72:278-83.
77. **Khan KN, Masuzaki H, Fujishita A, Kitajima M, Hiraki K, Miura S, Sekine I, Ishimaru T.** Peritoneal fluid and serum levels of hepatocyte growth factor may predict the activity of endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2006; 85:458-66.
78. **Kirken RA, Wang YL.** Molecular actions of sirolimus: sirolimus and mTor. *Transplant Proc* 2003; 35:227S-30S.
79. **Klyszcz T, Jünger M, Jung F, Zeintl H.** Cap image: a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy. *Biomed Tech* 1997; 42:168-75.
80. **Kobayashi H.** Invasive capacity of heterotopic endometrium. *Gynecol Obstet Invest* 2000; 50 Suppl 1:26-32.
81. **Kraft CN, Hansis M, Arens S, Menger MD, Vollmar B.** Striated muscle microvascular response to silver implants: A comparative in vivo study with titanium and stainless steel. *J Biomed Mater Res* 2000; 49:192-9.
82. **Kuebler WM, Kuhnle GE, Groh J, Goetz AE.** Contribution of selectins to leucocyte sequestration in pulmonary microvessels by intravital microscopy in rabbits. *J Physiol* 1997; 501:375-86.
83. **Kyama CM, Debrock S, Mwenda JM, D'Hooghe TM.** Potential involvement of the immune system in the development of endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1:123.
84. **Laird AD, Vajkoczy P, Shawver LK, Thurnher A, Liang C, Mohammadi M, Schlessinger J, Ullrich A, Hubbard SR, Blake RA, Fong TA, Strawn LM, Sun L, Tang C, Hawtin R, Tang F, Shenoy N, Hirth KP, McMahon G, Cherrington.** SU6668 is a potent antiangiogenic and anti-tumor agent that induces regression of established tumors. *Cancer Res* 2000; 60:4152-60.
85. **Laschke MW, Menger MD, Vollmar B.** Ovariectomy improves neovascularization and microcirculation of freely transplanted ovarian follicles. *J Endocrinol* 2002; 172:535-44.

86. **Laschke MW, Elitzsch A, Vollmar B, Menger MD.** In vivo analysis of angiogenesis in endometriosis-like lesions by intravital fluorescence microscopy. *Fertil Steril* 2005; 84 2:1199-209.
87. **Laschke MW, Elitzsch A, Vollmar B, Vajkoczy P, Menger MD.** Combined inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor, but not inhibition of VEGF alone, effectively suppresses angiogenesis and vessel maturation in endometriotic lesions. *Hum Reprod.* 2006a; 21:262-8.
88. **Laschke MW, Elitzsch A, Scheuer C, Holstein JH, Vollmar B, Menger MD.** Rapamycin induces regression of endometriotic lesions by inhibiting neovascularization and cell proliferation. *Br J Pharmacol.* 2006b; 149:137-44.
89. **Laschke MW, Elitzsch A, Scheuer C, Vollmar B, Menger MD.** Selective cyclo-oxygenase-2 inhibition induces regression of autologous endometrial grafts by down-regulation of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis and stimulation of caspase-3-dependent apoptosis. *Fertil Steril.* 2007; 87:163-71.
90. **Laschke MW, Rücker M, Jensen G, Carvalho C, Mülhaupt R, Gellrich NC, Menger MD.** Incorporation of growth factor containing matrigel promotes vascularization of porous PLGA scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 2008; 85:397-407
91. **Lebovic DI, Bentzien F, Chao VA, Garrett EN, Meng YG, Taylor RN.** Induction of an angiogenic phenotype in endometriotic stromal cell cultures by interleukin-1beta. *Mol Hum Reprod* 2000; 6:269-75.
92. **Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K.** Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol* 1993; 143:1055-62.
93. **Leunig M, Yuan F, Menger MD, Boucher Y, Goetz AE, Messmer K, Jain RK.** Angiogenesis, microvascular architecture, microhemodynamics, and interstitial fluid pressure during early growth of human adenocarcinoma LS174T in SCID mice. *Cancer Res* 1992; 52:6553-60.
94. **Leunig M, Demhartner TJ, Sckell A, Fraitzl CR, Gries N, Schenk RK, Ganz R.** Quantitative assessment of angiogenesis and osteogenesis after transplantation of bone: comparison of isograft and allograft bone in mice. *Acta Orthop Scand* 1999; 70:374-80.
95. **Ley K, Allietta M, Bullard DC, Morgan S.** Importance of E-selectin for firm leukocyte adhesion in vivo. *Circ Res* 1998; 83:287-94.
96. **Lindahl P, Johansson BR, Leveen P and Betsholtz C.** Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* 1997; 277:242-45.
97. **Lipowsky HH, Zweifach BW.** Application of the "two-slit" photometric technique to the measurement of microvascular volumetric flow rates. *Microvasc Res* 1978; 15:93-101.
98. **Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-75.
99. **Lysz TW, Needleman P.** Evidence for two distinct forms of fatty acid cyclooxygenase in brain. *J Neurochem* 1982; 38:1111-7.

100. **Lysz TW, Zweig A, Keeting PE.** Examination of mouse and rat tissues for evidence of dual forms of the fatty acid cyclooxygenase. *Biochem Pharmacol* 1988; 37:921-7.
101. **Maas JW, Groothuis PG, Dunselman GA, de Goeij AF, Struijker-Boudier HA, Evers JL.** Development of endometriosis-like lesions after transplantation of human endometrial fragments onto the chick embryo chorioallantoic membrane. *Hum Reprod* 2001; 16:627-31.
102. **Malik E, Meyhöfer-Malik A, Berg C, Böhm W, Kunzi-Rapp K, Diedrich K, Rück A.** Fluorescence diagnosis of endometriosis on the chorioallantoic membrane using 5-aminolaevulinic acid. *Hum Reprod* 2000; 15:584-8.
103. **Matsuzaki S, Canis M, Murakami T, Dechelotte P, Bruhat MA, Okamura K.** Immunohistochemical analysis of the role of angiogenic status in the vasculature of peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 2001a; 76:712-6.
104. **Matsuzaki S, Murakami T, Uehara S, Yokomizo R, Noda T, Kimura Y, Okamura K.** Erythropoietin concentrations are elevated in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Hum Reprod* 2001b; 16:945-48.
105. **Matsuzaki S, Canis M, Darcha C, Dallel R, Okamura K, Mage G.** Cyclooxygenase-2 selective inhibitor prevents implantation of eutopic endometrium to ectopic sites in rats. *Fertil Steril* 2004; 82:1609-15.
106. **McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Millican SA, Muller KH, Sharkey AM, Smith SK.** Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. *J Clin Invest* 1996b; 98:482-89.
107. **Mendel DB, Laird AD, Smolich BD, Blake RA, Liang C, Hannah AL, Shaheen RM, Ellis LM, Weitman S, Shawver LK, Cherrington JM.** Development of SU5416, a selective small molecule inhibitor of VEGF receptor tyrosine kinase activity, as an anti-angiogenesis agent. *Anticancer Drug Des* 2000; 15:29-41.
108. **Menger MD, Hammersen F, Walter P, Messmer K.** Neovascularization of prosthetic vascular grafts. Quantitative analysis of angiogenesis and microhemodynamics by means of intravital microscopy. *Thorac Cardiovasc Surg* 1990; 38:139-45.
109. **Menger MD, Pelikan S, Steiner D, Messmer K.** Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox". *Am J Physiol* 1992; 263:H1901-6.
110. **Menger MD, Lehr HA.** Scope and perspectives of intravital microscopy - bridge over from in vitro to in vivo. *Immunol Today* 1993; 14:519-22.
111. **Menger MD, Vajkoczy P, Beger C, Messmer K.** Orientation of microvascular blood flow in pancreatic islet isografts. *J Clin Invest* 1994; 93:2280-5.
112. **Menger MD, Bonkhoff H, Vollmar B.** Ischemia-reperfusion-induced pancreatic microvascular injury. An intravital fluorescence microscopic study in rats. *Dig Dis Sci* 1996; 41:823-30.

113. **Menger MD, Laschke MW, Vollmar B.** Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. *Eur Surg Res* 2002; 34:83-91.
114. **Meyer R.** The status of adenomyosis and adenomyoma, with a discussion of seroepithelial adenomyosis and sarcomatose adeno-myometritis. *Zel Gynaecol* 1919; 43:745-50
115. **Moghissi KS.** Medical treatment of endometriosis. *Clin Obstet Gynecol* 1999; 42:620-32.
116. **Morris RE.** Rapamycins: antifungal, antitumor, antiproliferative and immunosuppressive macrolides. *Transplant* 1992; 6:39-87.
117. **Mukherjee D, Nissen SE, Topol EJ.** Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *JAMA* 2001; 286:954-9.
118. **Nap AW, Griffioen AW, Dunselman GA, Bouma-Ter Steege JC, Thijssen VL, Evers JL, Groothuis PG.** Antiangiogenesis therapy for endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:1089-95.
119. **Nap AW, Groothuis PG, Demir AY, Maas JW, Dunselman GA, de Goeij AF, Evers JL.** Tissue integrity is essential for ectopic implantation of human endometrium in the chicken chorioallantoic membrane. *Hum Reprod* 2003; 18:30-34.
120. **Nguyen M, Shing Y, Folkman J.** Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Microvasc Res* 1994; 47:31-40.
121. **Nikitenko LL, MacKenzie IZ, Rees MC, Bicknell R.** Adrenomedullin is an autocrine regulator of endothelial growth in human endometrium. *Mol Hum Reprod* 2000; 6:811-9.
122. **Ning S, Laird D, Cherrington JM and Knox SJ.** The antiangiogenic agents SU5416 and SU6668 increase the antitumor effects of fractionated irradiation. *Radiat Res* 2002; 157:45-51.
123. **Nisolle M, Casanas-Roux F, Anaf V, Mine JM, Donnez J.** Morphometric study of the stromal vascularization in peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 1993; 59:681-4.
124. **Norrby, K.** Basic fibroblast growth factor and de novo mammalian angiogenesis. *Microvasc Res* 1994; 48:96-113
125. **Nothnick WB, D'Hooghe TM.** Medical management of endometriosis: novel targets and approaches towards the development of future treatment regimes. *Gynecol Obstet Invest* 2003; 55:189-98.
126. **Osuga Y, Tsutsumi O, Okagaki R, Takai Y, Fujimoto A, Suenaga A, Maruyama M, Mo-moeda M, Yano T, Taketani Y.** Hepatocyte growth factor concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Hum Reprod* 1999; 14:1611-13.
127. **Ota H, Igarashi S, Sasaki M, Tanaka T.** Distribution of cyclooxygenase-2 in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and adenomyosis. *Hum Reprod* 2001; 16:561-6.
128. **Papenfuss HD, Gross JF, Intaglietta M, Treese FA.** A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold. *Microvasc Res* 1979; 18:311-8.

129. **Papetti M and Herman IM.** Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282:C947-70.
130. **Penning LC, Dubbelman TM.** Fundamentals of photodynamic therapy: cellular and biochemical aspects. *Anticancer Drugs* 1994; 5:139-46.
131. **Piva M and Sharpe-Timms KL.** Peritoneal endometriotic lesions differentially express a haptoglobin-like gene. *Mol Hum Reprod* 1999; 5:71-78.
132. **Polverini PJ, Cotran PS, Gimbrone MA Jr, Unanue ER.** Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature* 1977; 269:804-6.
133. **Povlishock JT, Rosenblum WI, Sholley MM, Wei EP.** An ultrastructural analysis of endothelial change paralleling platelet aggregation in a light/dye model of microvascular insult. *Am J Pathol* 1983; 110:148-60.
134. **Prewitt RL, Johnson PC.** The effect of oxygen on arteriolar red cell velocity and capillary density in the rat cremaster muscle. *Microvasc Res* 1976; 12:59-70.
135. **Pries AR.** A versatile video image analysis system for microcirculatory research. *Int J Microcirc Clin Exp* 1988; 7:327-45.
136. **Rawson JM.** Prevalence of endometriosis in asymptomatic women. *J Reprod Med* 1991; 36: 513-5.
137. **Reed MW, Miller FN.** Importance of light dose in fluorescent microscopy. *Microvasc Res* 1988; 36:104-7.
138. **Reinhold HS, Endrich B.** Tumor microcirculation as a target for hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 1986; 2:111-37.
139. **Reynolds LP, Killilea SD, Redmer DA.** Angiogenesis in the female reproductive system. *FASEB J* 1992; 6:886-92.
140. **Ribatti D, Vacca A, Roncali L, Dammacco F.** The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis. *Int J Dev Biol* 1996; 40:1189-97.
141. **Ribatti D, Vacca A, Roncali L, Dammacco F.** The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on anti-angiogenesis. *Curr Pharm Biotechnol* 2000; 1:73-82.
142. **Ribatti D, Nico B, Vacca A, Roncali L, Burri PH, Djonov V.** Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo. *Anat Rec* 2001; 264:317-24.
143. **Risau W.** Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386:671-4.
144. **Rosenblum WI.** Fluorescence induced in platelet aggregates as a guide to luminal contours in the presence of platelet aggregation. *Microvasc Res* 1978; 15:103-6.
145. **Rücker M, Laschke MW, Junker D, Carvalho C, Tavassol F, Mülhaupt R, Gellrich NC, Menger MD.** Vascularization and biocompatibility of scaffolds consisting of different calcium-phosphate compounds. *J Biomed Mater Res A* 2008, im Druck

146. **Rüsse I.** Die Fruchthüllen des Vogels. *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*. Paul Parey, Berlin, Hamburg. 204-206.
147. **Russell WW.** Aberrant portions of the müllerian duct found in an ovary. Ovarian cysts of müllerian origin. *Bulletin of the John Hopkins Hospital* 1899; 10:8-10.
148. **Ryan IP, Tseng JF, Schriock ED, Khorram O, Landers DV and Taylor RN.** Interleukin-8 concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril* 1995; 63:929-32.
149. **Ryan IP, Taylor RN.** Endometriosis and infertility: new concepts. *Obstet Gynecol Surv* 1997; 52:365-71.
150. **Ryschich E, Schmidt E, Maksan SM, Klar E, Schmidt J.** Expansion of endothelial surface by an increase of vessel diameter during tumor angiogenesis in experimental and hepatocellular and pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10:3171-4.
151. **Saetzler RK, Jallo J, Lehr HA, Philips CM, Vasthare U, Arfors KE, Tuma RF.** Intravital fluorescence microscopy: impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes. *J Histochem Cytochem* 1997; 45:505-13.
152. **Sagsveen M, Farmer JE, Prentice A, Breeze A.** Gonadotrophin-releasing hormone analogues for endometriosis: bone mineral density. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; CD001297.
153. **Samaha HS, Kelloff GJ, Steele V, Rao CV, Reddy BS.** Modulation of apoptosis by sulindac, curcumin, phenylethyl-3-methylcaffeate, and 6-phenylhexyl isothiocyanate: apoptotic index as a biomarker in colon cancer chemoprevention and promotion. *Cancer Res* 1997; 57:1301-5.
154. **Sampson JA.** Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissues into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927; 14:422-69.
155. **Sandberg T, Ehinger A, Casslén B.** Paracrine stimulation of capillary endothelial cell migration by endometrial tissue involves epidermal growth factor and is mediated via up-regulation of the urokinase plasminogen activator receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:1724-30.
156. **Sandison JD.** A new Method for the microscopic study of living growing tissues by the induction of a transparent chamber in the rabbit's ear. *Anat Rec* 1924; 28: 281-7.
157. **Sano H, Hla T, Maier JA, Crofford LJ, Case JP, Maciag T, Wilder RL.** In vivo cyclooxygenase expression in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis and rats with adjuvant and streptococcal cell wall arthritis. *J Clin Invest* 1992; 89:97-108.
158. **Sato N, Beitz JG, Kato J, Yamamoto M, Clark JW, Calabresi P, Raymond A and Frackelton AR Jr.** Platelet-derived growth factor indirectly stimulates angiogenesis in vitro. *Am J Pathol* 1993; 142:1119-30.
159. **Saumet JL, Dittmar A, Leftheriotis G.** Non-invasive measurement of skin blood flow: comparison between plethysmography, laser-Doppler flowmeter and heat thermal clearance method. *Int J Microcirc Clin Exp* 1986; 5:73-83.

160. **Schmidt EE, MacDonald IC, Groom AC.** Interactions of leukocytes with vessel walls and with other blood cells, studied by high-resolution intravital videomicroscopy of spleen. *Microvasc Res* 1990; 40:99-117.
161. **Schönbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S, Libby P.** Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1999; 155:1281-91.
162. **Sharpe KL, Zimmer RL, Griffin WT, Penney LL.** Polypeptides synthesized and released by human endometriosis differ from those of the uterine endometrium in cell and tissue explant culture. *Fertil Steril* 1993; 60:839-51.
163. **Sheu JR, Fu CC, Tsai ML, Chung WJ.** Effect of U-995, a potent shark cartilage-derived angiogenesis inhibitor, on anti-angiogenesis and anti-tumor activities. *Anticancer Res* 1998; 18:4435-41.
164. **Shifren JL, Tseng JF, Zaloudek CJ, Ryan IP, Meng YG, Ferrara N, Jaffe RB, Taylor RN.** Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:3112-18.
165. **Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E.** Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359:843-5.
166. **Sigal NH, Dumont FJ.** Cyclosporin A, FK-506, and rapamycin: pharmacologic probes of lymphocyte signal transduction. *Annu Rev Immunol.* 1992;10:519-560.
167. **Silverman NR, Intaglietta M, Simon AL, Tompkins WR.** Determination of pulmonary pulsatile perfusion by fluoroscopic videodensitometry. *J Appl Physiol* 1972; 33:147-9.
168. **Simmons DL, Botting RM, Hla T.** Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* 2004; 56:387-437.
169. **Smith SK.** Angiogenesis. *Semin Reprod Endocrinol* 1997;15:221-7.
170. **Smith WL, Lands WE.** Oxygenation of polyunsaturated fatty acids during prostaglandin biosynthesis by sheep vesicular gland. *Biochemistry* 1972; 11:3276-85.
171. **Somigliana E, Viganò P, Rossi G, Carinelli S, Vignali M, Panina-Bordignon P.** Endometrial ability to implant in ectopic sites can be prevented by interleukin-12 in a murine model of endometriosis. *Hum Reprod* 1999; 14:2944-50.
172. **Steinbauer M, Harris AG, Abels C, Messmer K.** Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbecks Arch Surg* 2000; 385:290-8.
173. **Stephan S, Datta K, Wang E, Li J, Brekken RA, Parangi S, Thorpe PE, Mukhopadhyay D.** Effect of rapamycin alone and in combination with antiangiogenesis therapy in an orthotopic model of human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10:6993-7000.

174. **Suzumori N, Zhao XX, Suzumori K.** Elevated angiogenin levels in the peritoneal fluid of women with endometriosis correlate with the extent of the disorder. *Fertil Steril* 2004; 82:93-6.
175. **Tamura M, Fukaya T, Murakami T, Uehara S, Yajima A.** Cytogenetic analysis of cells from endometriotic cysts of the human ovary. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; 102:155-7.
176. **Taylor RN, Ryan IP, Moore ES, Hornung D, Shifren JL, Tseng JF.** Angiogenesis and macrophage activation in endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 828:194-207.
177. **Taylor RN, Lebovic DI, Mueller MD.** Angiogenic factors in endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 955:89-100.
178. **Thorlacius H, Lindbom L, Raud J.** Cytokine-induced leukocyte rolling in mouse cremaster muscle arterioles is P-selectin dependent. *Am J Physiol* 1997; 272:H1725-9.
179. **Torres Filho IP, Hartley-Asp B, Borgström P.** Quantitative angiogenesis in a syngeneic tumor spheroid model. *Microvasc Res* 1995; 49:212-26.
180. **Tsujii M, DuBois RN.** Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 1995; 83:493-501.
181. **Tuettenberg J, Grobholz R, Korn T, Wenz F, Erber R, Vajkoczy P.** Continuous low-dose chemotherapy plus inhibition of cyclooxygenase-2 as an antiangiogenic therapy of glioblastoma multiforme. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005; 131:31-40.
182. **Ueda M, Yamashita Y, Takehara M, Terai Y, Kumagai K, Ueki K, Kanda K, Hung YC, Ueki M.** Gene expression of adhesion molecules and matrix metalloproteinases in endometriosis. *Gynecol Endocrinol* 2002; 16:391-402.
183. **Ueki M.** Histologic study of endometriosis and examination of lymphatic drainage in and from the uterus. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165:201-9.
184. **Unemori EN, Erikson ME, Rocco SE, Sutherland KM, Parsell DA, Mak J, Grove BH.** Relaxin stimulates expression of vascular endothelial growth factor in normal human endometrial cells in vitro and is associated with menometrorrhagia in women. *Hum Reprod* 1999; 14:800-6.
185. **Vajkoczy P, Menger MD, Vollmar B, Schilling L, Schmiedek P, Hirth KP, Ullrich A, Fong TA.** Inhibition of tumor growth, angiogenesis, and microcirculation by the novel Flk-1 inhibitor SU5416 as assessed by intravital multi-fluorescence videomicroscopy. *Neoplasia* 1999; 1:31-41.
186. **Vajkoczy P, Ullrich A, Menger MD.** Intravital fluorescence videomicroscopy to study tumor angiogenesis and microcirculation. *Neoplasia* 2000; 2:53-61.
187. **Vercellini P, Fedele L, Aimi G, Pietropaolo G, Consonni D, Crosignani PG.** Association between endometriosis stage, lesion type, patient characteristics and severity of pelvic pain symptoms: a multivariate analysis of over 1000 patients. *Hum Reprod* 2007; 22:266-71.
188. **Vernon MW, Wilson EA.** Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat. *Fertil Steril* 1985; 44:684-94.

189. **Vollmar B, Conzen P, Habazettl H, Adili F, Peter K.** Does nitrous oxide affect coronary micro-circulation? An intravital microscopic study in the canine heart. *Anesth Analg* 1995; 80:249-55.
190. **Vollmar B, Burkhardt M, Minor T, Klauke H, Menger MD.** A correlation of intravital microscopically assessed NADH fluorescence, tissue oxygenation, and organ function during shock and resuscitation of the rat liver. *Adv Exp Med Biol* 1998; 454:95-101.
191. **Von Recklinghausen F.** Adenomyomas and cystadenomas of the wall of the uterus and tube: Their origin as remnants of the wolffian body. *Wien Klin Wochenschr* 1896; 8:530.
192. **Wahl M, Unterberg A, Baethmann A.** Intravital fluorescence microscopy for the study of blood-brain-barrier function. *Int J Microcirc Clin Exp* 1985; 4:3-18.
193. **Webster MH, Patterson J.** The photo-electric plethysmograph as a monitor of microvascular anastomoses. *Br J Plast Surg* 1976; 29:182-5.
194. **Westermann S, Vollmar B, Thorlacius H, Menger MD.** Surface cooling inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced microvascular perfusion failure, leukocyte adhesion, and apoptosis in the striated muscle. *Surgery* 1999; 126:881-9.
195. **Wiederrecht GJ, Sabers CJ, Brunn GJ, Martin MM, Dumont FJ, Abraham RT.** Mechanism of action of rapamycin: new insights into the regulation of G1-phase progression in eukaryotic cells. *Prog Cell Cycle Res* 1995; 1:53-71.
196. **Williams CS, Tsujii M, Reese J, Dey SK, DuBois RN.** Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J Clin Invest* 2000; 105:1589-94.
197. **Wilson LM, Baldwin AL.** Effects of environmental stress on the architecture and permeability of the rat mesenteric microvasculature. *Microcirculation* 1998; 5:299-308.
198. **Winet H.** A horizontal intravital microscope-plus-bone chamber system for observing bone microcirculation. *Microvasc Res* 1989; 37:105-14.
199. **Yakupoglu YK, Kahan BD.** Sirolimus: a current perspective. *Exp Clin Transplant* 2003; 1:8-18.
200. **Yamaki K, Thorlacius H, Xie X, Lindbom L, Hedqvist P, Raud J.** Characteristics of histamine-induced leukocyte rolling in the undisturbed microcirculation of the rat mesentery. *Br J Pharmacol* 1998; 123:390-9.
201. **Yamauchi J, Vollmar B, Wolf B, Menger MD.** Role of TNF-alpha in local surgical trauma-induced microvascular dysfunction. *Dig Surg* 1999; 16:400-6.
202. **Yokoyama Y, Dhanabal M, Griffioen AW, Sukhatme VP, Ramakrishnan S.** Synergy between angiostatin and endostatin: inhibition of ovarian cancer growth. *Cancer Res* 2000; 60:2190-6.
203. **Yoshikawa H, Jimbo H, Okada S, Matsumoto K, Onda T, Yasugi T, Taketani Y.** Prevalence of endometriosis in ovarian cancer. *Gynecol Obstet Invest* 2000; 1:11-7.
204. **Zamah NM, Dodson MG, Stephens LC, Buttram VC Jr, Besch PK, Kaufman RH.** Transplantation of normal and ectopic human endometrial tissue into athymic nude mice. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 149:591-7.

-
205. **Zweifach BW.** The microcirculation in the intestinal mesentery. *Microvasc Res* 1973; 5:363-7.
206. **Zwissler B, Schosser R, Weiss C, Iber V, Weiss M, Schwickert C, Spengler P, Messmer K.** Methodological error and spatial variability of organ blood flow measurements using radio-labeled microspheres. *Res Exp Med* 1991; 191:47-63.

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen herzlich danken, die zur Entstehung der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Michael D. Menger und Dr. med. Matthias Laschke für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes tätig sein zu dürfen. Durch ihre stete Unterstützung und ihre konstruktive Kritik haben sie entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Mein persönlicher Dank geht an meinen Mann, Dr. med. Matthias Laschke, der durch seine fachkundige Anleitung und präzise Analyse mich in den Bereich der experimentellen Chirurgie einführte und während der gesamten Arbeit mit seinem Wissen unterstützte.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. Claudia Scheuer sowie Janine Becker bedanken, die mir bei der Erstellung von Laboranalysen und histologischen Präparaten hilfreich zur Seite standen. Außerdem bedanken möchte ich mich bei Frau Elisabeth Gluding, die mit ihrem Team in technischen und organisatorischen Fragen eine große Unterstützung war.

Besonders danke ich meinen Eltern, die mich jederzeit unterstützt und mir das Studium der Veterinärmedizin und meine Promotion ermöglicht haben. Vielen Dank an meine Familie, die immer für mich da ist.

10. Lebenslauf

Personalien

Name: Laschke, Antje Gertrud (geb. Elitzsch)
Geburtsdatum: 02.02.1976
Geburtsort: Borna
Konfession: k.A.
Eltern: Dipl.-Ing. Rudolf Elitzsch
Dipl.-Ing. Ursula Elitzsch (geb. Obst)

Schulische Ausbildung

1982-1990 Pestalozzi-Schule Borna
1990-1994 Gymnasium "Am Breiten Teich" Borna
1994 Abitur

Universitäre Ausbildung

1994 Studium der Veterinärmedizin an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig
1995 Vorphysikum
1996 Physikum
1997 1. Abschnitt der tierärztlichen Prüfung
1999 2. Abschnitt der tierärztlichen Prüfung
2000 3. Abschnitt der tierärztlichen Prüfung
3/2000 Approbation als Tierarzt

Praktika

1996	Praktikum über Landwirtschaft, Tierzucht und Tierhaltung Rinderfarm Beiersdorf GmbH Sachsen
1998	Praktikum Kleintierklinik Dr. Fietzek Hamburg
1999	Praktikum Schlacht- und Fleischtieruntersuchung EU-Schlachthof Torgau / Sachsen
1999	Wahlpraktikum Kleintierklinik Dr. Fietzek Hamburg
1999	Wahlpraktikum Tierklinik (Pferde) „An der Rennbahn“ Iffezheim

Beruflicher Werdegang

2000-2/2004	Assistentenstelle Tierklinik Dr. Meisel-Gehl Zweibrücken
seit 3/2004	Betreuungsvertrag Ria-Nickel-Tierheim, Homburg
seit 6/2005	Eröffnung einer Tierarztpraxis in Homburg

11. Publikationen

Originalarbeiten

Laschke MW, **Elitzsch A**, Vollmar B, Menger MD. In vivo analysis of angiogenesis in endometriosis-like lesions by intravital fluorescence microscopy. *Fertil Steril* 2005; 2:1199-209.

Laschke MW, **Elitzsch A**, Vollmar B, Vajkoczy P, Menger MD. Combined inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor, but not inhibition of VEGF alone, effectively suppresses angiogenesis and vessel maturation in endometriotic lesions. *Hum Reprod* 2006; 21:262-8.

Laschke MW, **Elitzsch A**, Scheuer C, Holstein JH, Vollmar B, Menger MD. Rapamycin induces regression of endometriotic lesions by inhibiting neovascularization and cell proliferation. *Br J Pharmacol* 2006; 149:137-44.

Laschke MW, **Elitzsch A**, Scheuer C, Vollmar B, Menger MD. Selective cyclo-oxygenase-2 inhibition induces regression of autologous endometrial grafts by down-regulation of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis and stimulation of caspase-3-dependent apoptosis. *Fertil Steril* 2007; 87:163-71.

Kongressbeiträge:

Elitzsch A, Laschke MW, Vollmar B, Schramm R, Ammon M, Harder Y, Menger MD. In vivo analysis of angiogenesis in heterotopically transplanted endometrium. 19. Schweizer Mikrozirkulationskongress Bern, 29. Januar 2005

Laschke MW, **Elitzsch A**, Vollmar B, Menger MD. In vivo analysis of angiogenesis in heterotopically transplanted endometrium. *J Vasc Res* 2004; 41:445-78.

Laschke MW, **Elitzsch A**, Vollmar B, Vajkoczy P, Menger MD. Combined inhibition of VEGF, FGF and PDGF signaling pathways effectively suppresses angiogenesis in endometriotic lesions. *J Vasc Res* 2006; 43:52-53.

